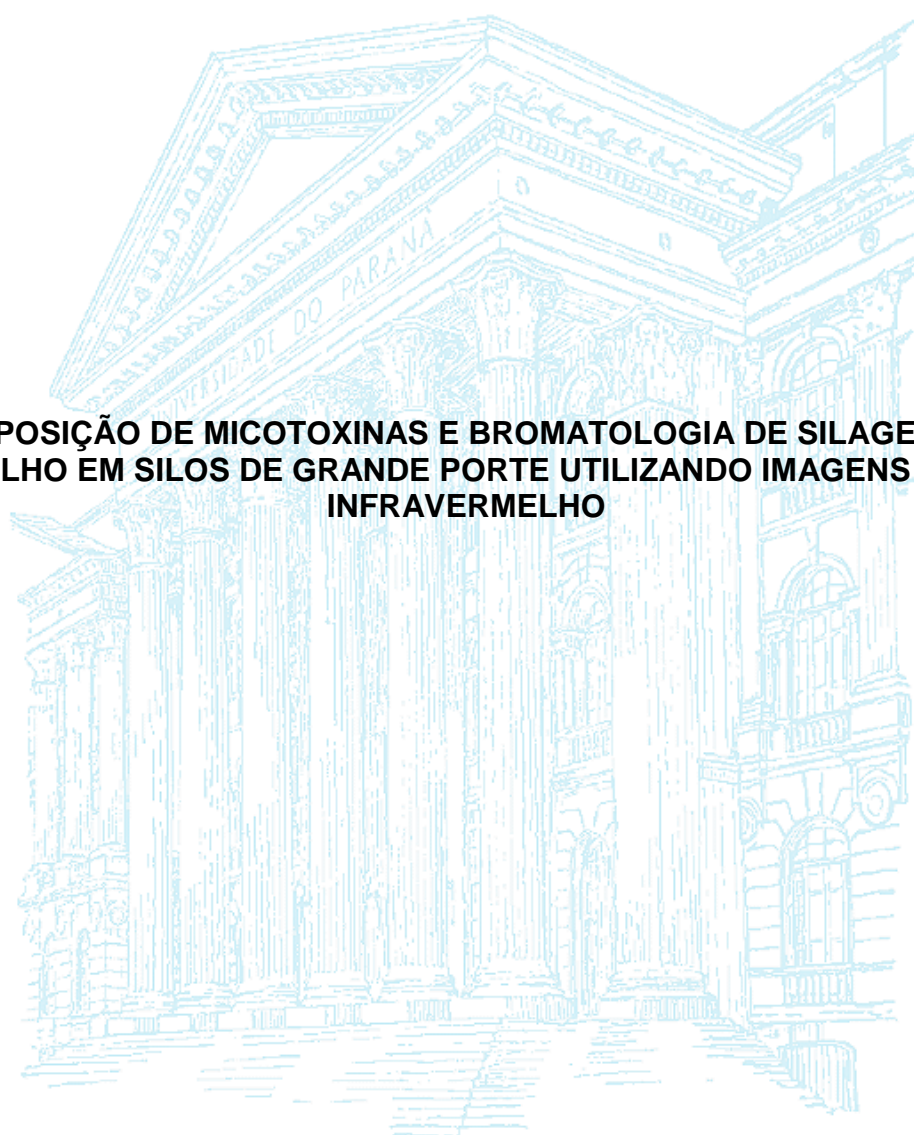


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CHARLES ORTIZ NOVINSKI

**COMPOSIÇÃO DE MICOTOXINAS E BROMATOLOGIA DE SILAGENS DE
MILHO EM SILOS DE GRANDE PORTE UTILIZANDO IMAGENS EM
INFRAVERMELHO**



CURITIBA

2013

CHARLES ORTIZ NOVINSKI
Zootecnista

**COMPOSIÇÃO DE MICOTOXINAS E BROMATOLOGIA DE SILAGENS DE
MILHO EM SILOS DE GRANDE PORTE UTILIZANDO IMAGENS EM
INFRAVERMELHO**

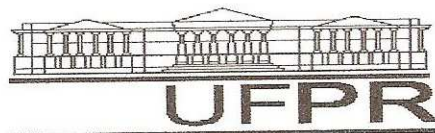
Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Nutrição Animal e Alimentação Animal, do Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador:
Prof. Dr. Patrick Schmidt

CURITIBA

2013

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“COMPOSIÇÃO DE MICOTOXINAS E BROMATOLOGIA DE SILAGENS DE MILHO EM SILOS DE GRANDE PORTE USANDO IMAGENS EM INFRAVERMELHO”** apresentada pelo Mestrando CHARLES ORTIZ NOVINSKI declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato APROVADO para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 22 de março de 2013.

Professor Dr. Patrick Schmidt
Presidente/Orientador

Professor Dr. Luiz Gustavo Nussio
Membro

Professor Dr. Rodrigo de Almeida
Membro

Aos meus queridos colegas do Centro de Pesquisa em Forragicultura e do Departamento de Zootecnia – UFPR que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

DEDICO

Aos meus queridos Pais pelo amor, carinho e preocupação, à minha amada esposa pelo incentivo, paciência e ajuda nos momentos difíceis dessa caminhada.

Minha Eterna Gratidão

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por sempre estar ao meu lado, dando-me forças nos momentos críticos e por sempre ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas.

Ao **Prof. Patrick Schmidt**, pela orientação e ensinamentos técnicos, e pela confiança depositada para condução desse trabalho e ainda por todas as oportunidades que me possibilitou durante esses anos de convivência, modelo de pessoa a ser seguido.

Ao **Prof. Rodrigo de Almeida** pela preciosa ajuda nas análises estatísticas, por todo empenho e tempo dedicado nesse trabalho.

Aos Professores **Alda Lúcia Gomes Monteiro** e **Peterson T. Dornbusch** pela disponibilidade em fazer parte do comitê de orientação.

As empresas **Castrolanda, COAMO, NUTRON** em especial ao **Huibert Pieter Janssen, Solano, Renato, Eduardo Vallias, Rogério, Adriana, Leonardo e Elinton**, por todo o apoio durante as viagens para coleta de amostras nos mais distantes lugares.

Ao grande amigo **Daniel**, companheiro de muitas viagens e histórias, pela valiosa ajuda durante a realização desse projeto, muito obrigado, especialmente pelas botas dentro do quarto e pela pinga, nunca, jamais esquecerei.....

Aos amigos **Elinton, Camilla, Karla, Cristiano** e mais recentemente **Severino**, pelos bons momentos e incentivos, que facilitaram a realização desse trabalho.

Ao **CNPq** pelo financiamento desse projeto, sem esses recursos nada disso seria possível.

A **CAPES** e ao programa **REUNI** pela concessão de bolsa de estudo.

A minha querida esposa **Rita de Cássia** pelo apoio e compreensão durante essa jornada, pelos momentos que deixei de lhe dar atenção. Agradeço pela importante ajuda na revisão e correção.

Ao meu filho **Luiz Eduardo** peço desculpa pela ausência nos momentos em que você precisava ou mesmo presente não pude brincar com você.

A Universidade Federal do Paraná, em particular aos Professores do Departamento de Zootecnia pelo convívio e amizade firmada.

A todos que não foram mencionados aqui, mas que de alguma maneira contribuíram para a realização desse projeto.

MEU MUITO OBRIGADO!

Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens em infravermelho

RESUMO

Objetivou-se avaliar o uso da termografia em infravermelho (TIV) como ferramenta indicadora da qualidade bromatológica e sanitária de silagens de milho em cinco regiões do Brasil. Foram visitadas 109 propriedades usuárias de silagem de milho nas bacias leiteiras de Castro (n = 32) e Toledo (n = 20) no Paraná, sudeste de Goiás (n = 14), sul de Minas Gerais (n = 23) e oeste de Santa Catarina (n = 20). Em cada propriedade, foram coletadas três amostras de silagem de milho, em pontos de diferentes temperaturas na face exposta do silo. Foram avaliadas a composição bromatológica e o teor das micotoxinas: aflatoxinas B1, B2, G1 e G2; zearalenona (ZEA); ocratoxina A (OTA); deoxinivalenol (DON) e fumonisinas B1 e B2 (FB B1, FB B2). As silagens se mostraram altamente variáveis em relação à composição bromatológica apresentando valores médios de 7,1%, 52,5%, e 65,2% para PB, FDN e NDT, respectivamente. Mais de 91% das amostras apresentaram algum tipo de micotoxina, sendo a maior incidência de ZEA (72,8%) e a menor de AFB1 (0,92%) das amostras positivas. A probabilidade de presença de micotoxina em cada ponto de temperatura foi estimada com base na razão entre probabilidades ajustadas (*adjusted odds ratio*). A probabilidade de detecção de ZEA em silagens produzidas em Castro foi maior do que nas demais localidades. Para a OTA a probabilidade de presença no ponto quente do painel do silo foi 66% maior que em relação ao ponto frio ($P < 0,02$), no entanto a baixa incidência (6,1%) não permite atribuir o efeito do aquecimento sobre a produção dessa micotoxina. No caso da DON a probabilidade de ser encontrada no ponto de aquecimento médio foi 46% maior que na temperatura mais baixa. A termografia foi eficiente na identificação dos pontos de maior aquecimento no painel do silo em 54,1% das avaliações, porém a temperatura pontual não pode ser utilizada como indicador para prever a qualidade bromatológica da silagem. A razão de probabilidade ajustada não permite afirmar que a temperatura no painel do silo está relacionada com a presença de micotoxinas em silagens de milho. As práticas agrônomicas adotadas na condução da lavoura, do plantio até o fornecimento aos animais são determinantes para controlar a concentração final de micotoxinas na silagem.

Palavras-Chave: aflatoxina, bovinos, bromatologia, fungos, termografia, zearalenona

Chemical composition and mycotoxins in maize silage using infrared thermography in large scale silos

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the infrared thermography (IRT) as a tool to indicate chemical composition and healthy of maize silages from five Brazilian regions. The farms (n = 109) were sampled in Castro (n = 32) and Toledo (n = 20) in Parana, Goiás (n = 14), Minas Gerais (n = 23) and Santa Catarina (n = 20). In each farm three samples of silo face were collected at different temperature sites. The chemical composition and the mycotoxins content were evaluated: aflatoxin B1, B2, G1, G2; zearalenone (ZEA); ochratoxin A (OTA); deoxynivalenol (DON); fumonisin B1 and B2 (FB B1, FB B2). Maize silages showed highly variable chemical composition with average value of 7.1%, 52.5%, e 65.2% of CP, NDF and TDN, respectively. Mycotoxins were found in more than 91% of the samples and ZEA was the most prevalent (72.8%). Only aflatoxin B1 was detected at a very low incidence (0.92%). The probability of mycotoxins occurrence in each temperature parameter was estimated based on the adjusted odds ratio. The probability of ZEA detection in silages produced in Castro was higher than in other locations. For OTA the probability of presence in the hot spot of silo face was 66% higher than in relation to the cold spot ($P < 0.02$), but the low incidence (6.1%) does not assign the heating effect on the this mycotoxin content. The probability of DON to be found at the medium heating spot was 46% greater than at the lowest temperature spot. The IRT was accurate to identify hot sites at the silo face in 54.1% of evaluations. However, the temperature can not be used to predict chemical composition of silages. The adjusted odds ratio did not show that the temperature in the silo face is related to the presence of mycotoxins in maize silage. The agricultural practices used on crop field, from planting to animal feed, are crucial to avoid mycotoxins in silages.

Key words: aflatoxin, bromatology, cattle, fungi, thermography, zearalenone

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – A) Classificação das 327 amostras em classes de 5 unidades percentuais mostrando a concentração dos valores de FDN das silagens de milho. B) Classificação das 327 amostras divididas em classes de 5 unidades percentuais, mostrando a concentração dos valores de NDT das silagens de milho. 54

FIGURA 2 – Concentração de micotoxinas (ppb) em relação a temperatura do painel do silo de 109 fazendas amostras no Brasil (F= ponto de temperatura fria, M= ponto de temperatura média, Q= ponto de temperatura quente). A OTA não foi considerada no gráfico pela baixa incidência. 66

FIGURA 3 – Porcentagem de amostras positivas nos diferentes pontos de aquecimento de 109 silos amostrados no Brasil (F= ponto de temperatura fria, M= ponto de temperatura média, Q= ponto de temperatura quente). 67

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Principais micotoxinas e fungos encontrados em silagens..... 34

QUADRO 2 – Número de propriedades classificadas de acordo com o tamanho de partícula da silagem de milho e o grau de compactação do silo (N = 108). 55

QUADRO 3 – Número de propriedades classificadas de acordo com o equipamento de colheita e picagem do milho e quanto ao tempo para fechamento do silo (N = 108) 57

QUADRO 4 – Número de propriedades classificadas de acordo com uso de aditivo na silagem de milho e quanto à presença de acompanhamento técnico (N = 105) 58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valor máximo aceitável de micotoxinas em silagens de milho estabelecidos pelos autores e legislações da União Européia e EUA 49

TABELA 2 – Coeficientes de correlações (*valores de r*, valores de P) entre temperaturas dos pontos no painel do silo, temperatura ambiente e composição bromatológica das silagens..... 51

TABELA 3 – Médias da composição bromatológica e valores mínimos e máximos observados em 327 amostras de silagem de milho coletadas em cinco regiões brasileiras..... 52

TABELA 4 – Médias da composição bromatológica das silagens de milho avaliadas em cinco regiões brasileiras..... 60

TABELA 5 – Médias da concentração de micotoxinas (ppb), incidência e valores mínimos e máximos detectados em 327 amostras de silagem de milho de cinco regiões brasileiras..... 61

TABELA 6 – Valor médio (ppb) e incidência (nº positivas/total) de micotoxinas nas regiões amostradas 65

TABELA 7 – Coeficientes de correlações (*valores de r*, valores de P) entre IPM, temperaturas dos pontos no painel do silo, tempo da última retirada e composição bromatológica das silagens..... 65

Tabela 8 – Resultado da regressão múltipla logística apresentando Adjusted Odds Ratio (AOR) (razão de probabilidade ajustada) de micotoxinas em Região e Temperatura. Intervalos de confiança 95% estão entre parênteses (95%)... 68

LISTA DE ABREVIATURAS

AF – Aflatoxina

AFB1 – Aflatoxina B1

AFB2 – Aflatoxina B2

AFG1 - Aflatoxina G1

AFG2 - Aflatoxina G2

AFM1 – Aflatoxina M1

BAL – Bactérias Ácido Láticas

°C – Graus Celsius

CPFOR – Centro de Pesquisa em Forragicultura

DVIVMS – Digestibilidade verdadeira in vitro de matéria seca

DON – Deoxinivalenol

DP – Desvio Padrão

EE – Extrato etéreo

F – Ponto de menor temperatura no painel do silo (Frio)

FB – Fumonisina

FB1 – Fumonisina 1

FB2 – Fumonisina 2

FB3 – Fumonisina 3

FDA- Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

GO – Goiás

ha – Hectare

M- Ponto de temperatura média no painel do silo (Médio)

MG – Minas Gerais

MS - matéria seca

N-FDA - Nitrogênio contido na fibra em detergente ácido

N-FDN – Nitrogênio contido na fibra em detergente neutro

OTA – Ocratoxina

PB – Proteína bruta

pH – Potencial hidrogeniônico

ppb – parte por bilhão

ppm – parte por milhão

PR – Paraná

Q – Ponto de maior temperatura no painel do silo (Quente)

RS – Rio Grande do Sul

SC – Santa Catarina

SP - São Paulo

TIV- Termografia em Infravermelho

UFC – Unidade Formadora de colônias

ZEA – Zearalenona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Importância da silagem de milho na alimentação de ruminantes.....	17
2.2 Caracterização da planta de milho.....	18
2.3 Objetivo da conservação de forragens.....	20
2.4 Processo fermentativo	21
2.4.1 Microrganismos envolvidos no processo fermentativo de silagens.....	22
2.4.1.1 Bactérias	24
2.5 Degradação aeróbia.....	25
2.5.1 Bactérias envolvidas na degradação aeróbia.....	26
2.5.1.1 Bacillus.....	27
2.5.1.2 Enterobactéria.....	28
2.5.1.3 Clostridium	29
2.5.2 Fungos envolvidos na degradação aeróbia.....	30
2.5.2.1 Leveduras	31
2.5.2.2 Fungos Filamentosos.....	32
2.5.3 Micotoxinas	33
2.5.3.1 Micotoxinas em silagens de milho.....	34
2.5.3.2 Zearalenona (ZEA).....	35
2.5.3.3 Fumonisinhas B1 e B2	37
2.5.3.4 Deoxinivalenol (DON).....	38
2.5.3.5 Ocratoxina (OTA)	39
2.5.3.6 Aflatoxina (AF)	40
2.5.4 Termografia em infravermelho	41
2.5.4.1 Utilização da Termografia em Infravermelho na produção animal	42
2.5.4.2 Limitações da TIV	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5 CONCLUSÃO	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICES	84

1 INTRODUÇÃO

Todos os dias milhares de toneladas de forragens conservadas são utilizadas para alimentação volumosa de ruminantes em todo o mundo. A ensilagem de forragens está entre os métodos mais difundidos de conservação, permitindo um estoque de alimento de qualidade por longos períodos. O sucesso na ensilagem é alcançado quando o processo permite o desenvolvimento de bactérias anaeróbias que fermentam carboidratos em ácidos. A fermentação adequada depende de alguns fatores importantes, tais como: umidade correta no material, picagem, pH, anaerobiose, disponibilidade de açúcar e presença de microrganismos desejáveis. Na ausência de alguns desses fatores o desenvolvimento de organismos como alguns fungos (leveduras e fungos filamentosos) e bactérias (clostrídeos, listérias, enterobactérias) poderá ocorrer, resultando na diminuição do valor nutritivo da silagem, bem como na produção de compostos potencialmente tóxicos para os animais.

Entre os principais organismos nocivos na silagem encontram-se os fungos filamentosos. São temidos nos alimentos destinados aos animais devido à produção de compostos extremamente tóxicos, conhecidos como micotoxinas, que causam perdas imensuráveis.

Micotoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos. Essas substâncias são apontadas como causadoras de distúrbios metabólicos e doenças em animais e humanos, podendo ser encontradas em uma variedade de alimentos como cereais, silagens e pastagens (Driehuis, 2011). No entanto, a simples presença de cepas produtoras de toxinas nos alimentos não é fator determinante para a ocorrência de micotoxinas, porquanto a formação desses componentes depende de uma série de fatores como: estresse térmico, reprodução, competição por substrato, além de condições ambientais.

O crescimento de microrganismos no painel do silo na fase de pós-abertura gera produção de calor, que é associada com a degradação da silagem (Kung Jr et al., 2000). A variável denominada “estabilidade aeróbia” é comumente mensurada em ensaios laboratoriais como sendo o tempo em horas para aquecimento da silagem em 2 °C acima da temperatura ambiente (O’Kiely et

al., 2001), determinando o início da deterioração do material. Contudo, o monitoramento da temperatura em silos de fazenda se torna complexo e bastante variável em função da grande área do painel dos silos e da falta de controle ambiental. Dessa forma, equipamentos modernos utilizando a termografia em infravermelho (TIV) mostram-se com amplo potencial de aplicação para determinação de variáveis que estejam relacionadas à temperatura.

Hoje existem vários métodos para lidar com a presença destes compostos nos mais diversos alimentos, desde equipamentos de alta precisão de análise até uso de substâncias que inativam as micotoxinas. Metodologias e equipamentos que permitem determinar com precisão quantidades mínimas desses compostos nos alimentos já estão sendo usados, no entanto, são análises caras e demoradas.

Técnicas de detoxificação biológica (Kiesling et al., 1984), métodos físicos (Yousef & Marth, 1986) e métodos químicos (Mckenzie, 1997), já foram desenvolvidos e com resultados satisfatórios, porém são impraticáveis para situações em fazendas comerciais. Outra ferramenta que já é amplamente utilizada pelos produtores devido à fácil aplicação e custo relativamente baixo é a utilização de enteroabsorventes. Essas substâncias são capazes de se ligar com as toxinas no trato gastrointestinal dos animais impedindo a absorção e evitando seus efeitos adversos. Os produtos existentes apresentam resultados interessantes, porém, não são eficientes para todas as micotoxinas, e representam um custo adicional na alimentação.

Técnicas para otimizar o processo fermentativo e melhorar a qualidade da silagem estão sendo constantemente desenvolvidas (Digman & Shinnors, 2011). Equipamentos capazes de gerar informações em tempo real estão sendo adotados para determinar a qualidade dos produtos, o que possibilita tomada de decisões muito mais rápido.

Assim, métodos rápidos, baratos e preventivos devem ser estudados pois estratégias com o objetivo de prevenção de ingestão de micotoxinas podem ser consideradas mais eficientes e seguras.

Diante disso o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma nova metodologia; rápida, segura e barata para determinação da qualidade

bromatológica e sanitária de silagens de milho por meio da utilização da termografia em infravermelho (TIV).

Para melhor entendimento e organização desta dissertação a redação foi realizada da seguinte forma:

- Revisão bibliográfica

Apresenta uma visão geral do problema, apontando todas as variáveis envolvidas na produção de silagens, bem como as falhas que contribuem para a obtenção de um alimento de baixa qualidade. A discussão detalha os principais microrganismos envolvidos no processo fermentativo, mostrando em quais momentos eles estão ativos, suas consequências como, por exemplo, produção de compostos tóxicos.

No final desta parte a termografia em infravermelho é apresentada desde sua descoberta até os dias atuais. Mostra o potencial uso dessa técnica em muitos segmentos e os resultados satisfatórios que estão sendo encontrados. No final são apontadas algumas limitações que essa técnica possui.

- Descrição do experimento realizado

Neste capítulo é descrita toda a metodologia desenvolvida para utilização da termografia em infravermelho em silos de grande porte. Apresenta todas as dificuldades encontradas em virtude de ser uma metodologia nova. Não existem relatos associando as imagens em infravermelho com a produção de micotoxinas ou qualidade bromatológica de silagens de milho.

Na sequência são apresentados os resultados encontrados e as explicações das possíveis causas. Apresenta-se também um censo realizado nas 109 fazendas visitadas, mostrando qual é a adoção de alguns procedimentos na produção de silagens, tais como: utilização de aditivo, assistência técnica para produção da silagem, tipo de máquinas.

Para finalizar, apresenta as conclusões e recomendações para pesquisas futuras utilizando essa promissora técnica na avaliação de variáveis envolvendo silagens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da silagem de milho na alimentação de ruminantes

Até o ano de 2050 a produção mundial de alimento deverá crescer em 70% devido o acréscimo de 2,3 bilhões de pessoas na população que hoje é de 7 bilhões segundo estimativas das Nações Unidas (2010). Essa responsabilidade está nas mãos dos países que ainda contam com terras agricultáveis como é o caso do continente africano e América Latina, especialmente o Brasil. O problema será agravado por conta do crescimento demográfico que acontecerá nas cidades, onde estimativas mostram que 70% da população viverá nos centros urbanos contra 49% nos dias atuais. O crescimento da população deve vir acompanhado do aumento da renda o que leva a um aumento no consumo de alimento, principalmente de proteína animal (carne e leite) (Steinfeld et al., 2006).

O crescimento na produção de alimento encontra grandes desafios para aumentar a produtividade. A criação de algumas barreiras ligadas principalmente a questões ambientais podem reduzir a capacidade de atender a demanda no futuro. É claro que regras devem ser criadas para permitir desenvolvimento de maneira sustentável, mas ações de grupos ativistas, excesso de regulamentações governamentais, falta de financiamento para pesquisa e decisões políticas sem critérios científicos criam enormes dificuldades para alcançar aquele objetivo. A agricultura de forma geral sempre é apresentada com um dos setores com grande impacto ambiental, por isso há necessidade de desenvolvimento de técnicas modernas de produção principalmente nos países em desenvolvimento que são vistos como grandes produtores mundiais de alimento.

A produção animal está se estabelecendo em países com clima favorável, água disponível, recursos naturais e humanos e tecnologia de produção, e por isso o Brasil vem ganhando status de celeiro para produção de alimentos para o mundo, por concentrar boa parte dessas virtudes. Dentro deste contexto a nutrição dos rebanhos é ponto fundamental para alcançar o aumento da produtividade e atender a demanda mundial de proteína animal.

Com a prática de confinamento dos animais a produção e conservação de alimento volumoso se torna obrigatória, sobretudo para gado leiteiro e gado de corte confinado. Diante do potencial produtivo desses animais, fatores ligados a qualidade das forragens conservadas são determinantes dentro do sistema.

A conservação de forragens na forma de silagem é a prática mais difundida pelo mundo para suplementação volumosa de ruminantes. As plantas utilizadas para esse fim compreendem as leguminosas e gramíneas tais como: alfafa, capins tropicais e de clima temperado, cana de açúcar, milho, sorgo, entre outras.

Entre as gramíneas, a planta de milho se destaca como uma das melhores opções para a produção de silagens, por características como metabolismo C4, que atribui alto potencial produtivo, elevado teor de energia na matéria seca, disponibilidade de carboidrato solúvel para fermentação e baixo poder tampão (Nussio et al., 2001).

Dessa forma, a silagem de milho é mundialmente usada como volumoso para produção de carne e leite, em épocas específicas ou durante o ano todo.

2.2 Caracterização da planta de milho

Os avanços científicos na engenharia genética permitiram a difusão da cultura do milho mundialmente. O desenvolvimento de plantas mais resistentes a seca e doenças, bem como plantas com aplicação específica para utilização como alimento humano, animal e biombustíveis, fazem do milho uma das mais cultivadas em todo o mundo.

É uma planta que tem sua origem nas Américas e por ser extensamente pesquisada possibilitou a criação de diferentes híbridos que podem ser cultivados em diferentes latitudes, desde o nível do mar até altitudes acima de 3,600 metros (Magalhães et al., 2002).

Fatores relacionando a produtividade de biomassa acima de 14 toneladas de MS/ha (Leonel et al., 2009) junto com a adequada composição nutricional da parte vegetativa contribuíram para a utilização desta planta como alimento para os animais.

A planta de milho tornou-se amplamente utilizada como forragem conservada devido suas características de qualidade, facilidade de manejo, boa fermentação e aceitação pelos animais. A qualidade nutricional da silagem de milho é facilmente afetada pelas práticas de condução da lavoura, clima e manejo do silo, no entanto os valores médios de composição bromatológica descritos na literatura são de 27,8; 8,0; 2,4; 53,5; 28,4; 2,4 e 69,3% para matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, lignina e nutrientes digestíveis totais, respectivamente (Velho et al., 2007).

No Brasil, o mais recente avanço obtido na produção de milho aconteceu em 2007 quando a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança liberou a comercialização de materiais geneticamente modificados resistentes a pragas. O milho conhecido como *Bt* contém genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que expressa a produção de uma proteína inseticida em seus tecidos. Quando ingerida pela praga (lagarta) causa intoxicação por dano nas células epiteliais do sistema digestório ocasionando morte desse indivíduo, e assim reduzindo a aplicação de inseticidas (Balieiro Neto et al., 2011).

Além dos benefícios alcançados no aumento de produtividade e menor utilização de defensivos, alguns trabalhos estão mostrando melhoras na qualidade sanitária com a utilização destes híbridos. A menor concentração de micotoxinas encontrada em plantas de milho com o gene *Bt* foi relatada por vários autores (Dowd, 2001; Bakan et al., 2002; Hammond et al., 2004), no entanto os resultados não são conclusivos, pois Calsamiglia et al. (2007) não perceberam diferença na concentração de micotoxinas entre os híbridos *Bt* e convencional.

Muitas questões sobre a utilização dos híbridos modernos (*Bt*) ainda necessitam ser esclarecidas para a população, pois a divulgação de informações, muitas vezes tendenciosas, apresenta essa tecnologia como algo prejudicial. Por outro lado, para o produtor novas perspectivas surgem para solução de problemas antigos na produção agropecuária. Porém, na pesquisa novos desafios se apresentam principalmente abordando os efeitos da proteína transgênica (*Cry*) sobre microrganismos funcionais presentes no solo, na saúde humana, nos animais e no meio ambiente. Indícios de alteração na

microbiologia do solo e do ecossistema como abordados por Saxena et al. (1999) e Batista Junior et al. (2002) acirram essa discussão.

Mesmo com todos os avanços alcançados com novas tecnologias, muitos híbridos recomendados para a produção de silagens ainda apresentam potencial produtivo e qualitativo aquém do desejado. Paziani et al. (2009) demonstraram que híbridos selecionados para produção de grãos são os principais materiais destinados para produção de silagem, ressaltando que o critério para escolha de um híbrido deve levar em conta a produção de matéria seca digestível por área, bem como maior produtividade de grãos.

2.3 Objetivo da conservação de forragens

Um sistema de produção animal eficiente (carne e leite) exige oferta de alimento de qualidade ao longo do ano com a finalidade de manter os níveis de produtividade estáveis. Essa eficiência deve ser entendida tanto como retorno financeiro na atividade quanto no menor impacto ambiental do sistema. Isso leva a um incremento em qualidade com obtenção de altos ganhos e utilização consciente dos recursos naturais com a mínima agressão ao meio ambiente. No entanto, o conceito de utilização da silagem na ração como ingrediente obrigatório no decorrer do ano deve ser analisado com cautela, pois nem todos os sistemas de produção permitem a aplicação desta prática, principalmente naqueles que seu uso ocorre apenas em épocas de escassez de pastagens.

A preocupação com a conservação de alimento para manutenção do rebanho é prática antiga. Junges (2010) citou trechos descritos na Bíblia para contextualizar essa necessidade tão longínqua, mostrando que à dois mil anos atrás já existia a necessidade de reservar alimento para manutenção dos rebanhos. Mesmo com essa necessidade tão marcante, ainda há produtores que não adotam nenhum tipo de conservação de forragem.

Algumas dificuldades podem ser citadas em relação à conservação de alimento na forma de silagem, sendo as mais comuns relativas a custo e disponibilidade de implementos. No entanto, Magalhães et al. (2004) mostraram que as despesas com alimentação volumosa (silagem de milho) chegou a 17,7% da receita obtida com a comercialização do produto, neste

caso leite, sendo que o concentrado representou 40%. Neumann (2006), avaliando o efeito do tamanho de partícula e da altura de corte da planta de milho sobre o desempenho de novilhos terminados em confinamento, mostrou que o custo da silagem representou 23,4% da dieta no período de 100 dias. Esses dados, embora desatualizados, evidenciam claramente que o volumoso representa uma fração menor no custo total da alimentação.

Deve se considerar que as silagens produzidas em muitas propriedades brasileiras possuem qualidade inferior a esperada para este tipo de alimento, bem como rendimento abaixo do potencial no que se refere a desempenho das plantas na lavoura. Esses índices são resultados da falta de cuidados na preparação, condução e desabastecimento do silo e ainda no cultivo da lavoura onde correção de acidez do solo, adubação e controle de doenças são negligenciados. O conjunto de todos esses fatores deletérios leva a obtenção de silagens de baixa qualidade nutricional com alto percentual de perdas e consequentemente de custo elevado de produção. E assim a equivocada afirmação de que a silagem tem alto custo dentro do sistema de produção se torna verdadeira, devido a menor quantidade de nutriente estocado por unidade de área. Por outro lado quando as boas práticas de produção da silagem são seguidas, obtém-se um produto de alta qualidade e em grande quantidade, caracterizando assim o objetivo principal da adoção desta prática que é o estoque de forragem com bom teor de energia digestível e de baixo custo.

Neste contexto, como a alimentação representa a maior parte dos custos de produção no sistema, deve-se adotar as práticas de forma criteriosas, visando otimizar o desempenho bioeconômico do sistema (Pereira et al., 2011). Considerado toda a cadeia de produção de ruminantes o setor de produção de leite se destaca pela constante inserção de tecnologias para promover a intensificação e longevidade do sistema visando competitividade pelo uso consciente dos recursos, logo toda ciência desenvolvida para maximização dos resultados deve ser apreciada para fazer parte do sistema.

2.4 Processo fermentativo

A ensilagem é a prática mais difundida de conservação de alimento para ruminantes. O processo tem como princípio privar microrganismos, que

colonizam naturalmente a planta, do oxigênio com o objetivo de estimular o metabolismo dos microrganismos anaeróbios. A mudança na população microbiana dá origem ao processo fermentativo que resulta na produção de ácidos orgânicos, principalmente os ácidos láctico, acético e propiônico, os quais possuem propriedades antimicrobianas. Enquanto a anaerobiose e a concentração dos ácidos forem mantidas o material permanecerá com seu valor nutritivo conservado.

O processo pode ser considerado ótimo quando a composição química da silagem se assemelha ao material que a originou. Para tanto, alguns fatores são determinantes para alcançar esse resultado tais como: quantidade de substrato fermentescível na forragem, cuidados na confecção da silagem e manejo pós abertura do silo.

2.4.1 Microrganismos envolvidos no processo fermentativo de silagens

Toda planta forrageira apresenta em suas estruturas (caule, folha, semente) colônias de microrganismos aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos denominados epifíticos. Fatores relacionados a localização geográfica e micro clima dentro da lavoura determinam quais espécies serão predominantes durante a fermentação. A quantidade e o tipo de microrganismo encontrado podem variar conforme a estrutura da planta, podendo ser maior nas folhas do que no caule, bem como em áreas lesionadas. Essa população é composta por bactérias e fungos que se multiplicam rapidamente quando a planta sofre o processo de picagem e tem seu conteúdo celular exposto (Lin et al., 1992).

A qualidade do processo é determinada pelo tipo de microrganismo que está atuando nas diferentes fases do processo fermentativo, que didaticamente é dividido em quatro (4) fases sendo três (3) fases anaeróbias e uma (1) fase aeróbia. As fases anaeróbias são: pré fechamento, fermentação ativa e estabilidade. A fase aeróbia ocorre no pós-abertura quando o material volta a ter contato com o ar.

A primeira fase é entendida entre o início do enchimento do silo até o fechamento. Nesta etapa mesmo com uma boa compactação e um rápido fechamento a quantidade de oxigênio dentro do silo ainda é alta. No entanto, o

sistema respiratório da planta e organismos aeróbios consomem rapidamente o oxigênio residual e as perdas por esse processo são consideradas pequenas (McDonald & Whittenbury, 1973).

Uma vez estabelecida a condição anaeróbia as enterobactérias iniciam uma rápida conversão de açúcares em lactato, acetato, succinato (McDonald et al., 1991), permanecendo dominantes até o terceiro dia pós fechamento. A medida que o pH é reduzido abaixo de 5 a atividade das enterobactérias diminui, e então as Bactérias Ácido Láticas (BAL) se tornam os organismos dominantes.

A atividade das BAL irá se estender até que o pH chegue a valores próximos a 3,7 ou ocorra a exaustão de substratos. A inatividade das BAL caracteriza o início da terceira e última fase fermentativa e indica o acúmulo máximo de ácidos orgânicos na silagem. Dessa forma, as propriedades nutritivas da forragem permanecem conservadas por longos períodos, desde que a vedação seja adequada evitando a penetração de oxigênio ou água.

No entanto, qualquer interferência negativa sobre as fases citadas anteriormente permitirá o crescimento de microrganismos indesejáveis tais como fungos e bactérias.

A fase de abertura do silo representa o ponto crítico de todo o processo da ensilagem, uma vez que o sucesso de preservação dos nutrientes conseguido na fase fermentativa pode ser colocado em risco nesta fase.

Imediatamente após a abertura do silo, a face exposta entra em contato com o oxigênio permitindo o desenvolvimento dos organismos aeróbios que foram inibidos pela anaerobiose. Dessa forma métodos e estratégias para retardar o desenvolvimento desses organismos vêm sendo desenvolvidos, como é o caso dos aditivos microbianos. Essa técnica utiliza cepas de bactérias selecionadas (*L. plantarum*, *L. buchneri*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Pediococcus cerevisiae*), com a função de alterar a composição dos ácidos e promover ganhos em fases específicas, como por exemplo diminuir perdas durante a fase fermentativa e ao mesmo tempo gerar compostos que exerçam efeito por um longo período após a exposição da silagem ao ar.

2.4.1.1 Bactérias

O uso estratégico da microbiologia na ensilagem pode ser entendido em duas etapas. Primeiro: microrganismos utilizados para minimizar perdas fermentativas durante a fase anaeróbia. Segundo: microrganismos que promovam melhor preservação de nutrientes após abertura do silo, ou seja, na fase aeróbia.

Em ambos os casos são utilizadas as Bactérias Ácido Lácticas (BAL) reconhecidas pela capacidade de produção de alguns ácidos, dentre eles láctico, acético e propiônico. Dentro desse grupo cinco gêneros são considerados importantes na fermentação da silagem: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*, reconhecidamente interessantes para a preservação da forragem (McDonald et al., 1991). Levando em conta o metabolismo fermentativo dessas bactérias, elas foram classificadas em dois grupos denominados homofermentativas e heterofermentativas.

As bactérias homofermentativas representadas pelos *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *S. bovis* possuem a característica de produção exclusivamente do ácido láctico a partir de hexoses (McDonald et al., 1991). A utilização destas espécies em silagens tem como propósito promover a eficiência fermentativa pela alta produção de ácido láctico a partir de carboidratos solúveis. Essa rápida produção de ácido láctico é capaz de reduzir rapidamente o pH inibindo a atividade de bactérias indesejáveis, principalmente as proteolíticas.

A indicação do uso de bactérias pertencentes ao grupo das heterofermentativas produtoras de ácido acético e propiônico tais como: *Lactobacillus buchneri*, *L. brevis*, *Pediococcus cerevisiae*, *Propionibacterium acidipropionici* e *P. shermani*, como aditivo na produção de silagens pode ser considerada como uma prática recente na história da conservação de forragens (Ranjit & Kung Jr. 2000). Até então estes microrganismos eram considerados indesejáveis no processo fermentativo, pois estavam relacionados com perdas de matéria seca durante a fermentação (Rotz & Muck, 1994). Além disso, a alta concentração do ácido acético em silagens foi correlacionada negativamente

com o desempenho animal, em virtude do baixo consumo voluntário de matéria seca (McDonald et al., 1991).

A descoberta de que algumas BAL heterofermentativas não eram capazes de fermentar a glicose até etanol em virtude da ausência da enzima acetaldeído-desidrogenase (Krieg & Holt 1984), juntamente com a característica de produção de outros ácidos, dentre eles o acético, foram determinantes na seleção destes microrganismos como inoculantes para silagens.

A utilização de microrganismos capazes de produzir ácido acético, propiônico, butírico com baixa perda de MS se tornou muito conveniente, principalmente para controle de leveduras em determinadas fases de utilização de silagens. Com o objetivo de avaliar o efeito inibitório dos ácidos acético, propiônico e láctico sobre leveduras ácido tolerantes, Moon (1983) isolou 4 espécies de leveduras (*Saccharomyces uvarum*, *Geotrichum candidum*, *Endomycopsis burtonii* e *Hansenula canadensis*) em silagens de alfafa e trigo. Neste estudo a autora concluiu que o acetato e o propionato mostraram uma importante redução na ação celular da levedura, e a combinação dos dois apresentou os melhores resultados.

2.5 Degradação aeróbia

O retorno da atividade microbiana na silagem após abertura do silo gera perdas sobre componentes nutritivos que poderiam ser aproveitados pelos animais. Logo após o desabastecimento do silo os ácidos produzidos durante a fase fermentativa ainda continuam exercendo efeito preservativo na silagem. No entanto a presença do oxigênio estimula o crescimento dos organismos aeróbios que iniciam a deterioração aeróbia da silagem.

O processo de deterioração é iniciado pela atividade de leveduras, que possuem a habilidade de utilizar produtos da fermentação, principalmente o lactato, como fonte energética em aerobiose (Jonsson & Pahlow, 1984). À medida que ocorre a degradação do ácido láctico o pH do meio tende a se elevar, facilitando o crescimento de outros agentes indesejáveis no material. Muito embora as leveduras sejam consideradas as principais responsáveis pela deflagração da deterioração aeróbia devemos considerar que algumas

bactérias também podem estar envolvidas no crescimento prévio de leveduras (Nishino, 2011).

2.5.1 Bactérias envolvidas na degradação aeróbia

Embora muitos trabalhos apontem as leveduras como principais iniciadoras da degradação aeróbia McDonald et al. (1991) as bactérias também podem contribuir para acelerar esse processo. Apesar do benefício no processo fermentativo algumas espécies estão envolvidas diretamente na espoliação aeróbia das silagens, agindo antes mesmo que as leveduras (Woelford & Wilkie, 1984).

As bactérias ácido acéticas são classificadas como gram-negativas e são frequentemente relacionadas com a deterioração aeróbia de silagens de milho e seu representante mais comum é do gênero *Acetobacter*. Na presença de oxigênio iniciam o crescimento utilizando como substrato álcool, açúcares, lactato e acetato produzindo dióxido de carbono e água (McDonald et al., 1991).

Essas bactérias são tolerantes a pH baixo, crescendo sobre a presença de ácido láctico e acético, bem como em aerobiose. No entanto o papel das bactérias ácido acéticas na ensilagem e na espoliação aeróbia ainda não são conclusivos (Nishino, 2011). Diante dessas características torna-se mais fácil entender o motivo pelo qual as bactérias ácido acéticas são encontradas sempre associadas com a atividade de leveduras, muitas vezes antes mesmo do que as próprias leveduras. Por outro lado inoculantes de silagens estão sendo desenvolvidos com cepas de bactérias acéticas selecionadas capazes de exercer efeito inibitório sobre leveduras (Ranjit & Kung Jr., 2000).

Estudos mostram que as bactérias ácido lácticas podem estar envolvidas na deterioração de silagens (Woelford, 1991). Esses microrganismos são anaeróbios facultativos extensamente utilizados para promover melhor padrão fermentativo em silagens de gramíneas e milho. Algumas dessas bactérias são capazes de oxidar lactato em acetato sob condições aeróbias e ausência de carboidratos solúveis. Esses microrganismos formam a maior população de bactérias encontradas na abertura do silo e se adaptam bem ao ambiente da silagem por tolerar baixo pH.

Um grande número de BAL é encontrado em silagens em deterioração sendo os *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. bulgaricus* as principais espécies identificadas. Seus efeitos sobre a instabilidade de silagens são considerados pequenos apesar de persistirem durante a fase de espoliação com atividade proteolítica, muito embora com baixa atividade não aumentando as concentrações de amins biogênicas e amônia no material (Nishino, 2011).

2.5.1.1 *Bacillus*

Os membros pertencentes a esse gênero são formadores de esporos, Gram-positivos e anaeróbios obrigatórios ou facultativos. Embora possam fermentar carboidratos em ácido láctico, acético e etanol não apresentam importância durante a fase fermentativa. Os *Bacillus* apresentam maior atividade nos estágios iniciais de fermentação e logo após a abertura do silo, onde as populações podem chegar a taxas entre 10^2 - 10^6 UFC/g de silagem (Woolford, 1990).

A principal preocupação com o *Bacillus spp.* está relacionada com a deterioração aeróbia de silagens. Pahlow et al. (2003) apontam que o gênero *Bacillus* é o primeiro grupo de microrganismos que atuam na degradação das silagens depois das leveduras iniciarem o processo de espoliação. Em silagens de cereais esses micróbios foram apontados como responsáveis pela inicialização da degradação, antes mesmo das leveduras (Woolford et al. 1982), fato semelhante pode acontecer em silagens tratadas com antibiótico ou com formaldeído (McDonald et al., 1991).

Independente do tipo da planta ensilada o pH é fator determinante para o desenvolvimento de *Bacillus*. Holden (1987) demonstrou em silagens de gramíneas esterilizadas com radiação gama que *Bacillus spp.* foram incapazes de iniciarem a deterioração e sugeriu que há a necessidade da presença de leveduras para elevação do pH e crescimento do *Bacillus*. As principais espécies de *Bacillus* encontrados em silagens deterioradas incluem *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. pumilus* (Li & Nishino, 2011).

A contaminação da silagem com esse agente ocorre principalmente pelo carreamento de terra para dentro do silo e aumenta consideravelmente quando é utilizado dejetos de animais na lavoura. Rammer et al. (1994) utilizando

dejetos de bovinos em lavouras de milho destinada para produção de silagem perceberam uma elevação do número destes microrganismos na forragem chegando a 10^5 UFC/g de matéria natural. Da mesma forma, dentro do silo as silagens das camadas próximas da superfície podem apresentar uma quantidade maior de *Bacillus* em relação as porções mais baixas, devido a maior condição anaeróbia dessas áreas (Lindgren et al., 1985).

A preocupação com a presença destes agentes na silagem esta relacionada com os estágios iniciais de deterioração e também com os riscos que podem causar para saúde humana e dos animais, que são contaminados via ingestão de leite (Vissers et al., 2007). Entre as espécies patogênicas atenção especial é dada ao *Bacillus cereus* considerado importante contaminante do trato digestivo dos animais. Produtor de enterotoxinas é responsável por sérias doenças, inclusive à saúde humana. No homem, a maior fonte de contaminação ocorre pelo consumo de leite, ou derivados lácteos sendo essa bactéria resistente às temperatura de pasteurização (Pahlow et al., 2003).

2.5.1.2 Enterobactéria

As enterobactérias são organismos anaeróbicos facultativos e podem sobreviver em ambientes com pH acima de 4,5 (Nishino, 2011), comum em silagens que tem uma baixa atividade das BAL ou apresentaram uma intensa oxidação dos ácidos láctico e acético, características de silagens degradadas. Dentre os microrganismos envolvidos na degradação aeróbia de silagens as enterobactérias estão entre as mais estudadas por serem considerados importantes agentes patogênicos para humanos, animais e plantas.

Informações divergentes são encontradas na literatura quanto a presença destas bactérias nas plantas. McDonald et al. (1991) descrevem que as enterobacterias representam a menor parte da microflora em pastagens e o murchamento diminuiu a contagem na forragem. Por outro lado, Nishino (2011) afirma que a população de enterobactérias nas plantas algumas vezes pode exceder o número das BAL e a quantidade de ambas pode aumentar durante o murchamento. Porém é consenso que a utilização de adubação com dejetos (suíno ou bovino) aumenta consideravelmente a quantidade dessas bactérias na silagem (McDonald et al., 1991; Rammer et al., 2006; Nishino, 2011).

A inoculação destas bactérias com o emprego de dejetos não traz prejuízo para a atividade das BAL nos primeiros momentos da ensilagem, uma vez que elas são inibidas quando o pH alcança valores abaixo de 4,5 (Pahlow et al., 2003). No entanto, se o pH demorar muito para baixar durante a fase inicial a proliferação dessas bactérias será intensa favorecendo a espoliação aeróbia.

O risco maior ocorre quando aquelas bactérias que sobreviveram ao processo fermentativo iniciam o crescimento no pós-abertura do silo, quando o pH se eleva, pois possuem atividade proteolítica produzindo amônia e aminas biogênicas, levando a diminuição do consumo de silagens pelos animais.

2.5.1.3 Clostridium

Os Clostrídeos são organismo Gram-positivo, formadores de esporos e em sua maior parte anaeróbios estritos e não se desenvolvem em ambientes ácidos ($\text{pH} < 4,5$). Crescem em silagens com baixos teores de carboidratos solúveis, alta umidade (acima de 70%) e alta capacidade tamponante. Essas características permitem uma lenta e insuficiente acidificação do meio ($\text{pH} > 4,6$) criando condições favoráveis para o desenvolvimento dessas bactérias. Por esses motivos são frequentemente encontradas em silagens de leguminosas (McDonald et al., 1991) e forrageiras tropicais (Adesogan et al., 2004).

De forma semelhante aos microrganismos citados anteriormente (enterobactérias) sua presença em silagens está relacionada a contaminação com solo ou aplicação de dejetos na lavoura. As espécies mais comuns encontradas em silagens incluem dois tipos principais: sacarolíticos e proteolíticos. Os primeiros possuem a capacidade de fermentar açúcares e ácidos orgânicos sendo representados pelos *C. butyricum* e *C. tyrobutyricum*. O segundo grupo pode fermentar açúcar além de aminoácidos, sendo responsáveis pela atividade proteolítica nas silagens, e são representados pelo *C. sporogenes* e *C. perfringes*. Essa quebra de proteína leva a produção de amônia e aminas biogênicas (Adesogan & Queiroz, 2009) acarretando em diminuição do valor nutritivo da silagem e também elevadas perdas de MS, que podem chegar a mais de 50% (McDonald et al., 1991).

A presença de Clostrídeos em silagens está relacionada com perdas que ocorrem na fase fermentativa, devido a atividade proteolítica, produção de

ácido butírico e compostos tóxicos. Poucos relatos relacionam estas bactérias com instabilidade aeróbia, mas aumento de esporos em silagens de capim inoculadas com *C. tyrobutyricum*, desafiadas na fase de estabilidade aeróbia, foram observados por Jonsson (1991), onde a contagem na abertura do silo passou de 10^5 UFC/g de silagem para 10^6 a 10^7 UFC/g após a deterioração aeróbia. Embora os *Clostridium* sejam anaeróbios obrigatórios essa possível atividade na fase pós-abertura se deve a possíveis locais anaeróbios em regiões do silo permitindo a multiplicação destes agentes (Nishino, 2011).

2.5.2 Fungos envolvidos na degradação aeróbia

O reino Fungi é composto por um grande número de organismos que se distinguem por serem heterotróficos, eucarióticos e aclorofilados com reprodução assexuada e sexuada. São diferentes dos animais e vegetais por não apresentarem tecidos especializados, sistema de órgãos e ainda por conter quitina em suas paredes celulares ao invés de celulose, como nas plantas (Alexopoulos et al., 1996). Sua nutrição é do tipo absorptivo, onde secretam enzimas (proteases, lipases, amilases, celulasas) as quais quebram as moléculas orgânicas complexas a simples monômeros, e assim torna-se possível à absorção de nutrientes (Gutierrez-Correa & Tengerdy, 1997).

Os fungos são classificados em dois grupos que levam em conta sua estrutura de crescimento:

Leveduras - apresentam crescimento unicelular, com célula em formato oval, e multiplicam assexuadamente;

Fungos filamentosos (mofos) - formam colônias multicelulares denominados hifas, que são importantes para a sobrevivência e dispersão dos fungos;

Durante a fase fermentativa (anaeróbia) os fungos filamentosos apresentam pouco prejuízo na qualidade nutricional da silagem. A grande preocupação ocorre quando a compactação e a vedação são inadequadas e ainda no descarregamento do silo, pois o contato com o oxigênio permite o crescimento da maioria dos fungos podendo comprometer a qualidade do material. Já as leveduras são importantes organismos a serem controlados tanto na fase fermentativa (anaeróbia) quanto na fase pós-abertura (aeróbia).

2.5.2.1 Leveduras

As leveduras são encontradas naturalmente no solo, nas plantas e na água. A superfície da planta possui uma variada população de leveduras sendo os gêneros mais encontrados: *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Torulopsis* (Lindgren et al., 1985). O número de leveduras pode aumentar consideravelmente durante o processo de murchamento ou quando há o carreamento de terra para o material a ser ensilado (McDonald et al., 1991).

A população de leveduras é composta por gêneros classificados como aeróbios obrigatórios e anaeróbios facultativos; por esse motivo a qualidade da vedação pode determinar quais espécies irão predominar durante a ensilagem (Jonsson & Pahlow, 1984), sendo a atividade de ambas considerada indesejável.

A atividade de leveduras durante a fase anaeróbia tem grande importância em silagens que apresentam alta disponibilidade de carboidrato solúvel, como é o caso da cana-de-açúcar. Neste tipo de material a intensa atividade deste microrganismo acarreta em elevadas produções de etanol, água e dióxido de carbono, resultando em grandes perdas de MS. Como as leveduras não tem seu crescimento inibido pelo baixo pH, podendo suportar valor inferior a 2 (Woolford, 1990; McDonald et al., 1991), tampouco pela anaerobiose, seu controle neste tipo de material torna-se difícil, porém necessário.

O uso de produtos que reduzem a atividade das leveduras é feito sob duas óticas principais: reduzir perdas de valor nutritivo e MS da forragem durante a fermentação e inibir o desenvolvimento desses organismos na exposição aeróbia da silagem.

Na silagem de milho e cereais o papel principal das leveduras está relacionado com a deterioração aeróbia (Ranjit & Kung Jr., 2000; Filya et al., 2004). A população de leveduras na maioria das silagens expostas ao ar pode aumentar exponencialmente, passando de 10^2 UFC/g até 10^{12} UFC/g em poucos dias (Woolford, 1990; Middelhoven, 1998).

A população de leveduras que se desenvolve durante a fase de exposição aeróbia da silagem pode ser dividida em dois grupos, que diferem entre si pelo tipo de substrato utilizado para produção de energia. O primeiro grupo que inclui as espécies *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* possui elevada capacidade de

oxidação do ácido láctico (Pahlow et al., 2003). O segundo grupo que compreende a *Sacharomyces cerevisiae* apresenta elevada capacidade de metabolizar açúcar e menor aptidão de assimilar lactato (Sanderson, 1993). Essa capacidade de assimilar o ácido láctico e elevar o pH do meio, permite o crescimento de organismos oportunistas e agentes patogênicos, como os fungos filamentosos.

2.5.2.2 Fungos Filamentosos

A contaminação da silagem por fungos é determinada por uma série de fatores, como preparo do solo, tratamento das sementes, adubação, aplicação de fungicida, condições climáticas, híbridos resistentes a doenças, atividades sinérgicas e antagônicas entre fungos, ataque de pragas na lavoura (Edwards, 2004; Queiroz et al., 2011). Sabendo que essa contaminação é inevitável, os cuidados para diminuir o desenvolvimento da população fúngica nas fases subsequentes a colheita devem ser aumentados.

Os fungos filamentosos são classificados como organismos aeróbios obrigatórios e por isso estão relacionados com a fase de pós-abertura, podendo se desenvolver dentro do silo em áreas próximas a parede e ao topo, regiões sujeitas a maior penetração de oxigênio devido a maior porosidade.

Durante o período fermentativo a atividade dos fungos pode ser minimizada pela adoção de algumas práticas. A população de fungos na silagem em sua grande maioria é composta por espécies estritamente aeróbias pertencentes ao gênero *Fusarium*. Um rápido enchimento juntamente com uma compactação e vedação adequados, diminuem significativamente o crescimento dos fungos no interior do silo. No entanto, esses cuidados não eliminam completamente a possibilidade do desenvolvimento de algumas espécies como: *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Aspergillus fumigatus* e *Monascus ruber* que são frequentemente isoladas em silagens localizadas nas camadas superiores do silo ou próximas as laterais (Driehuis et al., 2008a).

Do ponto de vista nutricional, os fungos são indesejáveis por metabolizarem açúcares, lactato e celulose, importantes fontes energéticas para ruminantes. No aspecto sanitário, a presença deles na silagem pode resultar na produção de compostos tóxicos (micotoxinas) ou esporos alérgicos que constituem fator

de risco para os animais e humanos que manipulam alimentos contaminados (Garon et al., 2006).

2.5.3 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos capazes de causar uma série de doenças e grandes perdas econômicas (Jouany & Diaz, 2005).

Os estímulos que levam o fungo a produzir substâncias tóxicas ainda não estão totalmente esclarecidos. Há indícios de que a produção de compostos secundários está relacionada com o processo de esporulação (Calvo et al., 2002). Os metabólitos secundários são formados durante a fase final de crescimento e não possuem qualquer função específica para desenvolvimento do fungo. No entanto, evidências mostram que são formados quando grandes quantidades de metabólitos primários estão acumulados no organismo. Logo, a produção de micotoxinas representa uma forma de redução deste acúmulo (Jay, 2005).

Outros autores afirmam que os fungos são capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas e antifúngicas com objetivo de aumentar sua competitividade diante da falta de substrato (Fink-Gremmels, 2005). Trabalhos mostram que quando o fungo percebe uma diminuição na disponibilidade de nutrientes, produz micotoxinas na tentativa de debilitar seu hospedeiro, e assim extrair mais substrato para completar seu ciclo de vida (Fox & Howlett, 2008).

Embora sejam conhecidos mais de 300 tipos de micotoxinas (Driehuis, 2011), os estudos e levantamentos relacionados à alimentação animal se concentram em menos de 10 (Jouany & Diaz, 2005).

Outra característica importante para entendimento da produção de micotoxinas em alimentos é o fato de a presença do mofo não indicar a presença de toxinas. Não está muito bem esclarecido na literatura, mas alguns autores atribuem essa falta de relação à necessidade de algum agente estressante ao fungo para produção de toxina. Outros pesquisadores afirmam que devido à característica hidrossolúvel dessas substâncias elas podem ser

carreadas para outras partes do alimento e por isso, algumas vezes, em locais mofados não há presença de toxina, explicando porque nem sempre o mofo pode ser utilizado como indicativo da existência de toxina.

2.5.3.1 Micotoxinas em silagens de milho

O conhecimento e a identificação de fungos e micotoxinas em silagens são de extrema importância, já que esse alimento compõe grande parte da dieta de ruminantes, notadamente vacas leiteiras. O assunto micotoxinas em silagens desperta muito interesse na pesquisa, pois esse alimento é propício ao crescimento fúngico, e essas substâncias representam um risco muito grande tanto para animais como para saúde humana.

As principais espécies de fungos e micotoxinas encontradas em silagens estão apresentadas no Quadro 1. A grande carência de trabalhos avaliando micotoxinas em silagens de forrageiras tropicais impede o conhecimento maior sobre esses componentes em silagens no Brasil.

QUADRO 1 – PRINCIPAIS MICOTOXINAS E FUNGOS ENCONTRADOS EM SILAGENS

Micotoxina	Espécie do fungo	Cultura
Aflatoxina B1, B2, G1 e G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Milho
Deoxinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Milho, gramíneas e cereais de inverno
Zearalenona	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Milho, gramíneas e cereais de inverno
Fumonisin B1 e B2	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Milho
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Cereais de inverno
Roquefortina C	<i>P. roqueforti</i>	Milho, gramíneas e cereais de inverno

Adaptado de Driehuis, (2011).

Antes da colheita as espécies de fungo *Fusarium* são as mais encontradas no campo. As plantas danificadas por insetos ou doenças estão sujeitas a maior infestação por esses fungos, servindo como fontes contaminadoras da silagem. No entanto, essas espécies não toleram ambientes anaeróbios e ácidos, e desaparecem em alguns dias na massa ensilada. Por outro lado, se a compactação e vedação permitirem a entrada de

oxigênio, fazendo com que haja deterioração do material, a concentração de micotoxinas aumenta consideravelmente. Cavallarin et al. (2004), analisando fumonisinas e zearalenona em silagens de milho de diferentes pontos do silo (topo e centro), demonstraram que as silagens provenientes das regiões periféricas continham maior concentração de micotoxinas em relação às áreas próximas ao centro. A manutenção de um ambiente anaeróbico não é possível após a abertura do silo, demonstrando o risco constante de produção de micotoxinas em silagens.

Outra espécie predominante em silagem de milho é o *P. roqueforti*. Devido sua capacidade de tolerar ambientes ácidos e com baixo oxigênio podem ser encontrados em silagens bem preservadas. O crescimento desse fungo é geralmente maior em áreas próximas à superfície do silo, especialmente em locais visivelmente mofados com coloração cinza (Driehuis et al., 2008a). Esses autores encontraram 100% de incidência desse fungo nesses pontos, e concentrações de 26 mg de roquefortina C por kg de silagem.

Há muitos levantamentos sobre a ocorrência de micotoxinas em grãos, principalmente aqueles destinados à alimentação animal. Porém, dados de levantamento de concentração e prevalência em silagens, principalmente em condições tropicais, são raros. Os relatos existentes demonstram que ZEA, DON, fumonisinas e roquefortina C são as mais encontradas em silagens de milho (Cavallarin et al., 2004; Garon et al., 2006; Driehuis, 2011).

2.5.3.2 Zearalenona (ZEA)

Zearalenona é um metabólito com capacidade estrogênica que pode causar impactos negativos sobre a fertilidade dos animais (Diekman & Green, 1992). A ZEA é produzida por várias espécies de fungos do gênero *Fusarium*, tais como: *F. graminearum*, *F. culmorum*. Na planta de milho esses fungos são responsáveis pela doença conhecida como podridão da espiga e do caule (Munkvold, 2003).

O *Fusarium* pode ser encontrado em culturas de trigo, milho e gramíneas. Contaminam as plantas via espiga, folha, caule e sementes (Driehuis, 2011) e por esse motivo merecem atenção especial quando a cultura é destinada para produção de silagem de planta inteira. Fatores ambientais, doenças, ataque de

insetos ou danos físicos geralmente estão relacionados com altas concentrações de micotoxinas na silagem, devido a maior presença de fungo na planta (Teller et al., 2012). Nesse mesmo estudo os autores demonstraram a evolução na concentração de micotoxinas nas plantas que sofreram lesão na espiga (danos mecânicos causados com faca) em diferentes períodos de permanência na lavoura. Plantas danificadas com nove dias antes da colheita apresentaram concentração média de ZEA de 80 ppb, plantas colhidas 27 dias após os danos tiveram um aumento na concentração que chegou a 2,64 ppm em virtude do favorecimento ao ataque e a colonização pelos fungos, principalmente *Fusarium*.

A concentração de ZEA na silagem de milho é muito variável. Isso ocorre conforme a região e cuidados com a lavoura. Todavia, em ensaios com protocolos experimentais definidos, a concentração encontrada variou entre 300 ppb (Oldenburg, 1993) e 1 ppm (Teller et al., 2012). Porém, em levantamentos de campo é percebida uma amplitude muito maior nos valores detectados.

Aragón & Rodrigues (2009) encontraram valores médios de 1059 ppb de ZEA em 227 amostras de silagem de milho oriundas de países da Ásia. No mesmo estudo, com 311 amostras de silagens provenientes da Europa, a concentração média foi de 129 ppb. Na Holanda, Driehuis et al. (2008a), analisando silagens de fazendas comerciais encontraram valores médios de 146 ppb, nas silagens das áreas centrais do silo. Garon et al. (2006), na França, avaliando um método de detecção múltiplo de micotoxinas em silagens de milho produzidas em fazenda, detectaram níveis entre 23 a 41 ppb.

A presença das *Fusarium*-toxinas (ZEA, DON e FB) está mais relacionada com fatores ligados à lavoura e a fase pós-abertura do que ao processo fermentativo (Oldenburg, 1993), embora possa ocorrer em silagens onde houve penetração de oxigênio durante a estocagem.

Quanto aos níveis de segurança ou concentrações esperadas de ZEA para silagem de milho especificamente, não há relatos na literatura estabelecendo valores máximos ou mínimos, o que impossibilita ampliar a discussão sobre valores de referência e diretrizes a serem seguidas para segurança humana e animal. Driehuis et al. (2008a) fizeram acompanhamento de 16 fazendas entre abril e dezembro de 2005 analisando micotoxinas em silagem de gramíneas,

silagem de milho e demais ingredientes das dietas. Junto com as amostras foram coletados dados de consumo dos animais. Com o resultado das análises micotoxicológicas foi possível estimar o consumo diário de cada micotoxina. Para vacas de alta produção com peso corporal médio de 600 kg a ingestão diária de ZEA foi de 0,5 mg por vaca, correspondente a 0,84 µg/kg de peso corporal. Os autores destacaram que a ZEA não representa risco para a saúde humana, uma vez que a taxa de transferência dessa micotoxina para o leite é baixa e concluíram dizendo que com os dados disponíveis a respeito dos efeitos adversos dessa toxina sobre os animais não permitem estabelecer valores máximos toleráveis, logo mais estudos são necessários. A ZEA pode ser convertida pela flora ruminal em α -zearalenol e β -zearalenol (Kiessling et al., 1984). A α -zearalenol possui maior efeito estrogênico que a toxina irmã β -zearalenol, e até mesmo do que a ZEA, no entanto a sua taxa de absorção é baixa. Uma vez absorvida pelo animal, o fígado consegue converter boa parte da α -zearalenol em β -zearalenol, diminuindo os efeitos nas vacas (Diekman & Green, 1992). Embora os ruminantes sejam tolerantes a essa micotoxina, Weaver et al. (1986) mostraram que doses diárias de 250mg/dia podem afetar o tamanho do corpo lúteo das vacas.

Segundo a FAO (2003) 16 países possuem legislação sobre limites de concentração de ZEA em alimentos destinados ao consumo humano, porém especificamente para silagem não há relatos. Os limites de ZEA em milho e outros cereais variam de 50 µg/kg (1 país) a 1000 µg/kg (8 países).

2.5.3.3 Fumonisinhas B1 e B2 (FB1 e FB2)

As fumonisinhas são um grupo de micotoxinas produzidas por duas principais espécies de fungos *Fusarium*: *F. verticilloides* e *F. proliferatum* (Whitlow & Hagler, 2004). Estes agentes estão associados com as doenças podridão rosa e branca em plantas de milho (Driehuis, 2011). As fumonisinhas FB1, FB2 e FB3 são as formas encontradas em milho em grão e silagens. Aragón & Rodrigues (2009) mostram baixa incidência de fumonissina B1 em silagem de milho. Das 227 amostras analisadas apenas 15 (6,6%) foram positivas para esta toxina com teores médios de 1519 ppb.

O nível de concentração pode variar muito em silagens dentro do mesmo silo. González-Pereyra et al. (2008) demonstraram que nas camadas inferiores do silo a concentração de fumonisina é menor em relação às áreas próximas da parede ou da regiões do topo, porém Cavallarin et al. (2004) não observaram o mesmo resultado quando compararam silagens de regiões visivelmente deterioradas com aquelas normais.

Várias causas estão envolvidas para determinar quais micotoxinas podem ser encontradas nas silagens. Pietri & Piva (2000) demonstraram que em condições de temperatura baixa e alta umidade os fungos que prevaleceram foram os *F. graminearum* e *F. culmorum* produtores de zearalenona, enquanto que em ambiente seco e quente as espécies encontradas foram *F. proliferatum* e *F. verticilloides* produtores de fumonisinas. Isso mostra que a presença de determinada espécie de fungo não permite predizer quais micotoxinas serão encontradas.

Embora a FB tenha sido descoberta na década de 80, hoje existem apenas 6 países com regulamentação para essa toxina em grãos de milho, que variam de 1000 a 3000 µg/kg (FAO, 2003)

2.5.3.4 Deoxinivalenol (DON)

Trata-se de outra toxina produzida pelas espécies de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrioides*, *F. roseum*) (Queiroz et al., 2011). Driehuis (2011) afirma que a DON e a ZEA são micotoxinas de ocorrência em amostras de silagem de milho contaminadas por *Fusarium*, aumentando o risco de doenças nos animais pelo efeito de associação das micotoxinas e pela alta inclusão desse volumoso na alimentação de ruminantes.

Garon et al. (2006) estudaram o comportamento da concentração de DON durante nove meses após a abertura do silo e notaram que a concentração de DON permaneceu estável durante o período de novembro a maio, com níveis entre 150 e 200 ppb.

Em levantamento feito por Aragón & Rodrigues (2009) 53% das amostras de 12 países da Ásia estavam contaminadas com essa micotoxina, com valores médios de 348 ppb e máximos de 5270 ppb. Esse mesmo trabalho

mostrou incidência de 83% nas amostras dos países Europeus com contaminação média de 564 ppb. Níveis elevados foram relatados por Whitlow & Hagler (2001) em silagens de milho analisadas no Estado da Carolina do Norte/EUA, onde das 778 amostras, 66% foram positivas para a presença de DON e concentração média de 1991 ppb.

A regulamentação de DON em alimentos foi realizada em apenas 37 países, do quais nenhum possuiu regras claras para silagens. Esses limites são estabelecidos para trigo, cevada e milho. A maior parte desses países está localizada na União Européia, e mesmo assim existe variação entre valores máximo permitidos que vão de 300 µg/kg a 2000µg/kg (FAO, 2003).

2.5.3.5 Ocratoxina (OTA)

A ocratoxina é produzida principalmente pelos fungos *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus alutaceus*, *A. ostianus*, *A. ochraceus* (Rossi et al., 2009), e frequentemente encontrada em grãos de cereais, frutas secas, vinho (Jouany e Diaz, 2005) e com menor frequência em silagem de milho (Garon et al., 2006, Driehuis et al., 2008a).

Díaz-Royón et al. (2012) realizaram um levantamento complexo analisando 32 micotoxinas em grãos de milho e sub-produtos durante o ano de 2011 no meio Oeste dos EUA. Neste levantamento a OTA foi encontrada em 18% das amostras com concentração média de 6,3 ppb. A presença e a concentração de OTA no milho estão relacionadas com a localização geográfica da lavoura, sendo mais frequentemente relatada em regiões de clima temperado, e que apresentaram condições ambientais desfavoráveis para as plantas (Driehuis et al., 2008b).

Trinta e sete países no mundo adotam limites para OTA em alimentos, dos quais 29 estabelecem 5 µg/kg como valor máximo aceitável, segundo a FAO, (2003).

2.5.3.6 Aflatoxina (AF)

As aflatoxinas são substâncias extremamente tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas. São produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e em menor proporção por *Aspergillus parasiticus* (Whitlon & Hagler, 2004).

A aflatoxina B1 é a forma mais prevalente das aflatoxinas e ao mesmo tempo considerada a mais tóxica. Quando ingerida pelo animal a AFB1 pode ser parcialmente convertida no rúmen ou ser absorvida diretamente. No fígado a AFB1 é transformada em aflatoxina M1 (AFM1), forma na qual pode ser excretada pelos fluídos corporais, tais como: urina e leite (Fink-Gremmels, 2008).

A incidência das aflatoxinas é baixa em silagens bem conservadas, devido à incapacidade relativa do fungo produtor dessa toxina tolerar ambientes anaeróbios e ácidos (Garon et al., 2006, Driehuis et al., 2008a, Driehuis, 2011). No entanto, se tais condições não forem mantidas, a possibilidade de crescimento fúngico pode resultar em altos níveis destas micotoxinas. González-Pereyra et al. (2008) relataram concentrações de 155,7 ppb de AFB1 em silagem de milho em condições inapropriadas de vedação. Entretanto, esses valores podem ser explicados pelo método laboratorial utilizado para detecção de aflatoxinas, onde a presença de alguns compostos da silagem, tais como pigmentos ou lipídios, podem interferir nos resultados causando erros de interpretação (GARON et al., 2006).

Amaral & Nussio (2011) observaram que mudanças ambientais durante o período de utilização do silo podem induzir a produção de aflatoxinas. No decorrer de um período de 14 semanas a silagem de milho foi monitorada pela contagem de fungos filamentosos e micotoxinas. No momento da abertura do silo não foi detectada a presença de aflatoxina B1 na silagem e a contagem de fungos filamentosos foi de 1,5 log/UFC/g com evolução ao longo dos meses. No início do período chuvoso (a partir de julho) foi percebido que com o aumento da precipitação pluviométrica houve elevação na concentração de AFB1 que chegou a 2,25 ppb, bem como na população de fungos com valores médios de 5,1 log/UFC/g de silagem.

Assim, evidencia-se que micotoxinas são componentes com grande possibilidade de ocorrência em silagens e, desta forma, seu monitoramento é importante para obtenção de dados confiáveis de incidência e prevalência. Contudo, poucos trabalhos avaliaram a incidência de micotoxinas em silagens, e os levantamentos disponíveis não consideraram as variáveis relativas à produção e uso das silagens nas propriedades avaliadas. Entre as micotoxinas que possuem regulamentação dos níveis permitidos em alimentos as aflatoxinas são as que possuem a mais completa legislação. Os limites máximos permitidos em alimento humano variam de 0 a 35µg/kg. Para ingredientes das dietas de vacas leiteiras o máximo permitido em 27 países é de 5 µg/kg, sendo que apenas dois países adotam os valores mais elevados de 50 µg/kg (FAO, 2003).

2.5.4 Termografia infravermelho

Os métodos de mensuração da temperatura podem ser divididos em duas categorias principais: medidas feitas com contato direto com o objeto avaliado e avaliação sem a necessidade de contato.

Os termômetros de contato são os mais comuns equipamentos usados para mensuração de temperatura. As respostas obtidas com este tipo de equipamento são lentas e em muitas situações as avaliações são limitadas, principalmente quando o ambiente apresenta risco ao operador.

Os equipamentos de avaliação de temperatura sem a obrigatoriedade de contato utilizam sensores que captam energia infravermelha emitida pelo objeto avaliado. A resposta é mais rápida e sua utilização permite alcançar lugares inacessíveis, tais como: ambientes hostis, alvos em movimento, ambientes com limitação física.

Os primeiros relatos sobre a radiação infravermelha foram feitos por Isaac Newton, em 1666, que realizou experimentos com protocolos exatos sobre a refração da luz com um prisma de vidro. Mais tarde, em 1800, Willian Herschel, Alemão naturalizado Inglês, prosseguiu com os trabalhos sobre óptica iniciados por Newton. Utilizando um termômetro de bulbo para medir a temperatura nas diferentes cores geradas pelo prisma, ele percebeu que a temperatura na

região pouco abaixo do espectro vermelho era maior do que a ambiente, concluindo então que existe radiação invisível ao olho humano. Em meados dos anos 1900 foram definidas a atividade do espectro eletromagnético e desenvolvidas equações que tornaram possível identificar a energia infravermelha (Rybicki & Lightam, 1979).

Na história mais recente, o uso da tecnologia infravermelha ficou restrito para fins militar e astronômico. A partir da década de 80 as primeiras câmeras tornaram-se disponíveis para uso civil. Desde então, o desenvolvimento de equipamentos mais precisos de menor custo tornou a utilização da termografia amplamente difundida nos mais diversos segmentos da indústria, da medicina (Berz & Sauer, 2007), e da agricultura.

A termografia em infravermelho (TIV) é uma tecnologia com amplo potencial de aplicação para determinação de variáveis que estejam relacionadas à temperatura, tais como no diagnóstico precoce de doenças (Agarwal et al., 1970), em ambientes industriais (Gruner, 2002), e mais recentemente na avaliação da degradação aeróbia de silagens de milho (Junges, 2010). A técnica para visualização do gradiente de temperatura consiste em um transdutor que converte a radiação infravermelha emitida por determinado objeto em sinal elétrico que é revelado em uma imagem. Embora incipiente, essa técnica é promissora na produção animal, podendo ser usada em todo e qualquer processo em que haja produção ou perda de calor para o ambiente.

2.5.4.1 Utilização da Termografia em Infravermelho na Produção animal

A TIV é uma técnica precisa de medida de temperatura que permite diagnosticar precocemente doenças em bovinos (Schaefer et al., 2004), problemas no aparelho locomotor de equinos (Eddy et al., 2001), ataque de pragas nas folhas de vegetais (Chaerle et al., 1999) e indicação de áreas de aquecimento em silagens submetidas a avaliações de estabilidade aeróbia (Junges, 2010). Mostra-se uma técnica vantajosa por ser um método não invasivo e poder ser utilizada distante do objeto avaliado, ideal em algumas situações de campo.

Colyn et al. (2010), avaliando a consumo alimentar residual (CAR) em bovinos de corte, apresentam resultados afirmando que a TIV é um método

promissor para predizer o CAR, mostrando-se útil para vacas adultas, bovinos em crescimento e bezerros, por possibilitar estimar as perdas de energia bruta pela imagem de forma rápida.

Montanholi et al. (2008), utilizando o recurso da termografia para predizer a produção de calor, produção de metano e alterações fisiológicas em vacas leiteiras, asseguraram que a TIV pode ser aplicada com sucesso para estimar tais variáveis, bem como mostrou-se útil para respostas fisiológicas da lactação e alimentação.

O monitoramento em tempo real da temperatura na superfície dos alimentos parece ser uma forma rápida e segura na predição da qualidade nutricional e microbiológica de muitos produtos.

Pesquisadores da Universidade de Pádova, na Itália, testaram a termografia em infravermelho para determinar a qualidade da silagem de milho após o processo fermentativo. Miotello et al. (2009) encontraram correlações altas entre temperatura e componentes químicos da silagem, mas não detalharam quais foram as variáveis bromatológicas correlacionadas.

Junges (2010), em estudo inovador com silagem de milho, usou a TIV para avaliar temperatura de silagens expostas ao ar em sala com temperatura controlada. As correlações entre a temperatura da superfície e a temperatura interna da massa apresentaram coeficiente moderado ($r = 0,55$ $P < 0,001$), mostrando que a imagem da superfície pode ser usada como indicador de pontos de crescimento microbiano. No entanto, concluiu que há necessidade de se ampliar o controle de outras variáveis, além daquelas estudadas por ele.

Abdelhadi et al. (2012) utilizaram a termografia com o objetivo de relacionar a temperatura da face do silo com a qualidade da silagem. As avaliações desse experimento foram realizadas em 18 fazendas de gado de leite e corte na Argentina. Todas as propriedades utilizavam silagem de milho em silos do tipo bunker e a imagem termográfica foi utilizada para localização de pontos de máximo e mínimo aquecimento. Não foi percebida correlação da temperatura com os parâmetros de qualidade (MS, PB, pH), no entanto, silagens coletadas nas áreas quentes tiveram redução na digestibilidade de matéria seca em relação ao ponto frio. Logo, os autores concluíram que a imagem em infravermelho pode ser utilizada para detectar regiões que representam menor digestibilidade da MS.

2.5.4.2 Limitações da TIV

Muito embora a termografia seja uma tecnologia que permita avaliar com precisão variáveis que estejam envolvidas com temperatura, alguns pontos críticos podem limitar sua utilização.

A avaliação por TIV identifica apenas a temperatura da superfície do objeto, e que pode apresentar valores bem distintos da temperatura interna do mesmo. Devido à grande sensibilidade do método para as variações de temperatura, as condições ambientais interferem fortemente na geração das imagens. A utilização da câmera em lugares abertos, sem controle ambiental, gera alta variabilidade nos dados coletados, por conta da influência dos raios solares, ventos, partículas suspensas no ar, umidade e composição de gases no ambiente, sobretudo entre a câmera e o objeto estudado.

Avaliando eficiência da ventilação natural no conforto de vacas estabuladas Knížková et al. (2002) perceberam que a velocidade da corrente do ar e a presença de microclimas dentro do galpão interferiram na intensidade do resfriamento da superfície corporal dos animais, impossibilitando a determinação do conforto térmico pela termografia.

A termografia é uma tecnologia que tem grande potencial de utilização na área de produção animal, podendo ser utilizada para diagnóstico precoce de estresse e doenças, bem como nas avaliações de estabilidade de silagens, monitoramento da temperatura das rações no cocho e, ainda, predição na produção de metano pelos animais, entre outras aplicações. Contudo, os valores indicados por esse método não podem ser interpretados de forma absoluta e o efeito ambiental, em condições de campo, pode impedir a comparação de diferentes objetos ou diferentes condições.

O presente experimento teve por avaliar a TIV como ferramenta para indicar a qualidade bromatológica e micotoxicológica de silagens de milho, tanto quanto realizar um levantamento de campo sobre a composição e concentração de micotoxinas nas silagens produzidas em cinco importantes bacias leiteiras do Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada pelo Centro de Pesquisas em Forragicultura (CPFOR), vinculado ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba/PR. Foram visitadas 109 propriedades distribuídas no Sul, Sudeste e Centro-oeste do Brasil, no período de 10/05 a 15/09/2010, abrangendo cinco importantes bacias leiteiras do país: Castro (n = 32) e Toledo (n = 20), no Paraná, Sudeste de Goiás (n = 14), Sul de Minas Gerais (n = 23) e Oeste de Santa Catarina (n = 20). As propriedades visitadas variaram em tamanho e nível tecnológico, de 15 até 3000 animais consumindo silagem. Os critérios para seleção das propriedades foram: as fazendas deveriam utilizar silagem de milho (silos em uso), representar a realidade e variabilidade da região (tamanho, aplicação de tecnologia), permitir a colheita de amostras e disponibilizar as informações solicitadas pela equipe do projeto. Esses critérios foram adotados com a finalidade de obter um retrato significativo da qualidade sanitária e nutricional das silagens de milho nas regiões amostradas.

Em cada propriedade, no momento da avaliação, foram tomadas variáveis ambientais, como temperatura ambiente (termômetro digital) e condições climáticas. Variáveis subjetivas sobre a aparência do silo e da silagem foram anotadas no questionário. Variáveis relativas ao sistema de produção, datas de plantio e colheita, histórico, entre outras, foram tomadas mediante entrevista com o proprietário e/ou gerente e/ou funcionário responsável. Ao todo, 33 variáveis foram colhidas mediante questionário (anexo) com objetivo de fornecer o maior número de informações que permitissem a interpretação futura dos resultados.

Devido à impossibilidade de padronização dos horários das avaliações, as visitas aconteceram no decorrer do dia. Após o preenchimento do questionário foram realizadas varreduras no painel do silo em uso na propriedade, usando-se câmera termográfica (FLUKE® Ti25) para identificação da amplitude de temperaturas mediante acompanhamento em tempo real das diferenças entre cores na termografia. Conhecendo o perfil calórico do painel foram identificados e marcados três pontos para as amostragens, como segue:

- Ponto Q – ponto de maior temperatura no painel do silo (quente);
- Ponto F – ponto de menor temperatura no painel do silo (frio);
- Ponto M – ponto de temperatura intermediária (médio).

As temperaturas externas (superficial) e internas (15 cm de profundidade) de cada um dos três pontos foram aferidas com termômetro pontual a laser em infravermelho (FLUKE® 66) e sonda de determinação de temperatura por contato, respectivamente. Esse procedimento teve como objetivo registrar as temperaturas internas e externas em cada ponto de amostragem.

Em cada um dos pontos foi coletada uma amostra de aproximadamente 1,1 kg da silagem, totalizando três amostras colhidas por silo. Essas amostras foram identificadas e acondicionadas a vácuo (Seladora Orved&Brock, Modelo EcoVacuum), em embalagens plásticas apropriadas, ainda na propriedade, para preservar as características originais da silagem até o retorno ao laboratório. O tempo máximo de duração das viagens para coletas das amostras foi de três dias. Logo, foi esse o maior período que as silagens permaneceram conservadas somente no vácuo. No laboratório as amostras foram congeladas, permanecendo assim até o processamento.

As amostras foram descongeladas completamente e uma alíquota de 25 g foi separada para aferição do pH, segundo metodologia descrita por Kung Jr. et al. (1984). O restante da amostra foi pesado e seco em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas para determinação do teor de matéria seca. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho tipo Wiley, com peneiras de crivos de 1 mm. Uma alíquota de 300 g de cada amostra seca e moída foi encaminhada para determinação de micotoxinas. Outra alíquota de 50 g foi usada para determinações bromatológicas.

As análises micotoxicológicas foram realizadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), vinculado à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria/RS. Foram determinadas as concentrações de aflatoxinas (AFLA B1, B2, G1 e G2); zearalenona (ZEA); ocratoxina A (OTA); deoxinivalenol (DON) e fumonisinas (FB B1 e FB B2). As análises foram realizadas pelos métodos HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) usando um equipamento Agilent série 1100 segundo metodologia AOAC, (1998) e LC-MS/MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) usando o equipamento API 5000™. Todos os valores foram

expressos em partes por bilhão (ppb). Os limites mínimos de quantificação nesse laboratório foram: 1 ppb para AFLA; 10 ppb para ZEA; 140 ppb para DON; 50 ppb para FB; 2 ppb para OTA.

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFPR. Os teores de Matéria Seca (MS) e cinzas foram determinados segundo metodologia descrita por AOAC, (2000). As frações Fibra em Detergente Neutro (FDN) e Fibra em Detergente Ácido (FDA) foram avaliadas pelo método sequencial no equipamento ANKOM®, segundo metodologia descrita por Holden (1999). O teor de lignina foi analisado pelo método de determinação ácida de lignina (VAN SOEST, 1963). O extrato etéreo (EE) foi determinado no equipamento ANKOM®, conforme metodologia de extração com solvente Éter de Petróleo. O teor estimado de nutrientes digestíveis totais (NDT) foi calculado usando-se a equação proposta por (WEISS et al., 1992). O procedimento usado para determinar os teores médios de nitrogênio contidos na fibra em detergente neutro (N-FDN) e na fibra em detergente ácido (N-FDA) foi multiplicar o teor de proteína de cada amostra por 16 e 7%, respectivamente (Sniffen et al., 1992) e também o fator de ajuste para processamento (FAP) de 0,94 (NRC, 2001).

A determinação da Proteína Bruta (PB) foi realizada pelo método de Dumas (WILES et al., 1998), em auto-analisador de nitrogênio (LECO® FP-528), no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba/SP.

Os valores de composição bromatológica foram tabulados por região e, além das médias e desvios padrão para cada variável, se calculou a variabilidade percentual entre valores mínimos e máximos encontrados. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($P < 0,05$) para a composição bromatológica, usando o SAS (versão 9.3).

Algumas das variáveis coletadas no questionário foram submetidas a análise estatística não-paramétrica. As frequências foram comparadas pelo teste de Qui-Quadrado a 5% de significância, conforme descrito por Pimentel Gomes (1984).

Para micotoxinas foram calculadas a incidência (número de amostras com concentrações detectáveis de micotoxina em relação ao número total de

amostras analisadas), as médias e os desvios-padrão dos valores nas amostras positivas, para cada região e para cada micotoxina analisada. As aflatoxinas B2, G1 e G2 não foram detectadas em quaisquer das amostras e foram excluídas da análise estatística.

A hipótese de normalidade para concentração de micotoxinas foi realizada usando o teste de Shapiro-wilk com a plotagem dos resultados que revelou deslocamento da curva para esquerda, isso em função da grande quantidade de amostras com níveis não detectáveis. Diante dessa situação optou-se pela categorização dos dados (positivos e negativos). A probabilidade da presença de micotoxina para cada ponto parametrizado de temperatura (Q, M ou F) foi estimada com base na estatística da razão entre probabilidades ajustadas (*adjusted odds ratio*), considerando a razão entre a probabilidade do evento ocorrer e a probabilidade do mesmo evento não ocorrer. Assim, os dados binários foram submetidos ao modelo de regressão logística usando o PROC GENMOD do SAS (versão 9.3). Dois fatores de risco foram incluídos no modelo como variáveis categóricas: Temperatura (quente, média e fria) e Região (Castro, Toledo, MG, GO e SC). Os resultados foram apresentados como razão de probabilidade ajustada (*Adjusted odds ratio - AOR*), com 95% de intervalos de confiança. A região de Toledo foi adotada como região de referência para as comparações, em função da menor incidência de micotoxinas e melhor qualidade nas silagens coletadas neste local. Para temperatura foi considerada a hipótese inicial, que propunha que nas áreas de temperatura mais baixa o nível de micotoxinas seria menor. Por esse motivo o ponto frio foi eleito como referência.

Para a zearalenona (ZEA), a transformação logarítmica (\log_{10}) promoveu a normalidade dos dados devido a maior incidência, tendo sido submetida à análise de variância ANOVA, usando o procedimento GLM do SAS (versão 9.3), sendo incluídos no modelo os efeitos de Temperatura e Região, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($P < 0,05$).

Devido à ausência de valores de referência na literatura para concentração de micotoxinas em silagens, propôs-se um Valor Máximo Aceitável (VMA) para a concentração de cada micotoxina em silagens de milho, baseando-se na literatura internacional disponível de trabalhos científicos e

legislação. Esses valores foram estabelecidos usando-se diferentes legislações internacionais sobre micotoxinas nas dietas de ruminantes, e estimativas de consumo de animais alimentados com silagem de milho, não considerando outras fontes de micotoxinas. Os VMA estabelecidos para silagens de milho (ppb) são: AFB1 = 19; ZEA = 285; OTA = 5; DON = 930; FB B1 + FB B2 = 1000.

TABELA 1 – VALOR MÁXIMO ACEITÁVEL DE MICOTOXINAS EM SILAGENS DE MILHO ESTABELECIDOS PELOS AUTORES E LEGISLAÇÕES DA UNIÃO EUROPÉIA E EUA

Micotoxina	VMA ¹ (ppb)	CEC ² (ppm)	FDA ³ (ppm)
Aflatoxina B1	19	*	10-100 (ppb)
Zearalenona	285	0,5	*
Deoxinivalenol	930	2	10
Ocratoxina A	5	**	*
Fumonisin B1+B2	1000	50	30-60

¹ Valores estabelecidos no presente ensaio

² The Commission of the European Communities (2006). Valores de referência em mg/kg (ppm) para ingredientes de ração animal com 12% de umidade. Os valores mostrados são alusivos a dietas completas de ruminantes.

³ Food and Drug Administration (FDA), Wood e Trucksess (1998)

* Não é mencionada na legislação

** Não tem especificação para ruminantes

Para efeito de comparações estatísticas entre amostras com diferentes incidências e teores de micotoxinas foi proposta a criação de um Índice Ponderal de Micotoxinas (IPM), sendo um valor único calculado usando-se a seguinte equação:

$$IPM = [(AFLA/19)+(ZEA/285)+(OTA/5)+(DON/930)+((FB \ B1+B2)/1000)] \\ \times [1+(NP/NT)]$$

onde: AFLA = concentração de aflatoxina B1 (ppb); ZEA = zearalenona (ppb); OTA = ocratoxina (ppb); DON = deoxinivalenol (ppb); FB = fumonisina (ppb); NP = número de micotoxinas com resultado positivo na amostra; NT = número total de micotoxinas avaliadas (6).

A estimativa desse índice foi realizada pela divisão da concentração de cada micotoxina avaliada pelo VMA estabelecido para silagem de milho. Ainda, um fator de correção é aplicado na fórmula, considerando a quantidade de micotoxinas que apresentaram resultado positivo na amostra. Essa decisão foi

tomada considerando-se que micotoxinas podem apresentar efeitos sinérgicos quando mais de uma está presente em um mesmo alimento.

A necessidade de criação do valor único de micotoxinas para ranquear as amostras permitiu melhorar a normalidade de distribuição desses dados. Então realizou-se correlação linear de Pearson entre variáveis de temperatura, IPM e componentes bromatológicos das silagens. As análises foram realizadas usando o PROC CORR do SAS (versão 9.3) com nível de confiança de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi verificada relação da temperatura com qualquer variável bromatológica. A TABELA 2 apresenta os coeficientes de correlação entre as temperaturas dos pontos de amostragens (interna e externa) e composição bromatológica.

TABELA 2 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÕES (*valores de r*, **valores de P**) ENTRE TEMPERATURAS DOS PONTOS NO PAINEL DO SILO, TEMPERATURA AMBIENTE E COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DAS SILAGENS

	TempExt	TempInt	NDT	MS	TempAmb	pH
TempExt		0,36	0,00	0,08	0,54	0,10
TempInt	<0,01		-0,05	0,12	0,10	0,39
NDT	0,90	0,35		0,37	0,05	0,00
MS	0,08	0,02	<0,01		0,11	0,39
TempAmb	<0,01	0,06	0,39	0,23		0,03
pH	0,06	<0,01	0,94	<0,01	0,68	

TempExt – temperatura da superfície do ponto amostrado; TempInt – temperatura interna (15 cm) do ponto amostrado; Tempamb – temperatura ambiente.

A elevação da temperatura é consequência da intensa atividade microbiana oxidando substratos presentes na massa, principalmente ácido láctico. Por esse motivo, foi observado uma moderada e significativa correlação entre temperatura interna da silagem (TempInt) e pH. Ficou evidente a interferência ambiental na superfície do silo, pelo coeficiente de correlação ($r=0,54$; $P<0,01$) entre temperatura ambiente (TempAmb) e temperatura externa no painel do silo (TempExt) medida por TIV. Correlações altas ($r=0,92$) entre as mesmas variáveis foram encontradas por Bowers et al. (2009). Esse fato demonstra importante influência que as variáveis ambientais exercem sobre a geração da imagem em infravermelho e experimentos futuros, com essa tecnologia, devem procurar anular esse efeito. Junges (2010) correlacionou as temperaturas da TIV com as temperaturas máximas, médias e mínimas da silagem submetida ao ensaio de estabilidade. O autor observou correlações fracas entre a TIV e a temperatura ambiente ($r=0,04$; $r=0,12$ e $r=0,19$ respectivamente). Esses valores reduzidos foram atribuídos ao controle térmico da sala onde o ensaio foi conduzido. Neste local a temperatura foi mantida em $25\pm1^{\circ}\text{C}$.

Na TABELA 3 estão apresentadas as médias e desvios-padrão, os

valores mínimos e máximos observados e o respectivo percentual de variação da composição bromatológica das silagens de milho.

Para todos os parâmetros avaliados observou-se grande variabilidade nos resultados, de 48 a 988%, entre os valores mínimos e máximos. O teor de MS das silagens apresentou variação de 148%, desde silagens extremamente úmidas (19,8% MS), até silagens muito secas (49,1% MS). Apenas 41,2% das silagens apresentaram teor de MS dentro da faixa ideal, entre 30 e 35%, conforme sugerido por Phipps et al. (2000).

Em silagens com teor de matéria seca abaixo de 30% (31,8% das amostras), o crescimento de bactérias do gênero *Clostridium* pode ser favorecido pela alta disponibilidade de água e pela diluição dos ácidos orgânicos no meio. Por outro lado, silagens muito secas, com teor de MS acima de 35% (26,5% das amostras) favorecem o crescimento de fungos filamentosos, que podem se desenvolver em materiais com atividade de água (aW) menor que 0.7, aumentando o risco de contaminação por compostos tóxicos. As amostras que continham os níveis máximos de ZEA, DON, FB1 e FB2 apresentavam teores de MS de 42,1; 36,3; 40,6 e 37,1%, respectivamente, ao passo que os menores foram encontrados em silagens com 33,1; 32,7; 29,0 e 33,7% MS, na mesma ordem. Diante disso, fica evidente que a colheita do milho com teor de MS ideal contribui para a diminuição da concentração de micotoxinas.

TABELA 3 – MÉDIAS DA COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA E VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS OBSERVADOS EM 327 AMOSTRAS DE SILAGEM DE MILHO COLETADAS EM CINCO REGIÕES BRASILEIRAS

Variável	Média ± DP ¹	Valor Mínimo	Valor Máximo	Variação percentual
Matéria Seca, %	32,4 ± 5,0	19,8	49,1	148%
Proteína bruta, %	7,1 ± 1,1	3,3	10,7	224%
FDN, %	52,5 ± 5,4	36,8	72,7	98%
FDA, %	26,3 ± 4,1	16,1	41,8	160%
EE, %	2,8 ± 0,61	0,83	4,88	488%
Lignina, %	4,0 ± 1,3	0,86	9,36	988%
NDT, %	65,2 ± 3,6	50,2	74,1	48%
Cinzas, %	3,3 ± 1,0	1,1	10,9	890%

¹ DP – desvio-padrão da média

Seis amostras apresentaram teor de cinzas superior a 6%, indicando possível contaminação com terra no silo, uma vez que para esse tipo de

alimento são esperados valores próximos a 4% para essa variável (NRC, 2001). Cento e trinta e quatro das 327 amostras apresentavam NDT abaixo de 65% e 97 amostras apresentaram teor de FDN acima de 55% como apresentado nas FIGURA 1 A e B. Esses valores indicam que uma parte significativa das amostras de silagens de milho apresentou parâmetros de qualidade aquém dos valores esperados para este tipo de volumoso, quando confrontado com o NRC (2001). Seis amostras apresentaram valores de FDN entre 36 e 41%, sendo que dessas, duas são do mesmo silo e as demais de silos diferentes. Essa constatação mostra a importância na forma de coleta de material para análise da composição bromatológica. É comum entre os técnicos e/ou produtores a coleta de apenas uma única amostra para representar toda a silagem estocada no silo, e esse laudo servirá para a formulação das dietas durante o ano todo. A maior porção das amostras (135) se concentrou na classe de 48-53% FDN. No extremo foram encontradas quatro amostras contendo acima de 66% de FDN.

Quando o valor médio (três amostras) foi utilizado para essa mesma representação, apenas uma propriedade apresentou valor de FDN dentro do intervalo de 36-41% e a maioria (50 amostras) ficou na classe de 48-53%. Quarenta e sete fazendas se destacaram com valores médios de FDN na silagem, entre 54 e 65%.

Para nutrientes digestíveis totais (NDT) o maior grupo de amostras ficou localizado na classe de 62-67% (213 amostras). Os menores valores (entre 50-55%) foram observados em sete amostras e o maior (entre 74-79%) foi observado em apenas uma amostra. Quando se trata de valores médios, 78 fazendas tiveram silagens entre 62-67% NDT e 21, valores entre 62-73%.

Do ponto de vista econômico estas silagens afetam negativamente os custos de produção, pois o volumoso de baixo valor nutritivo promove menor desempenho dos animais.

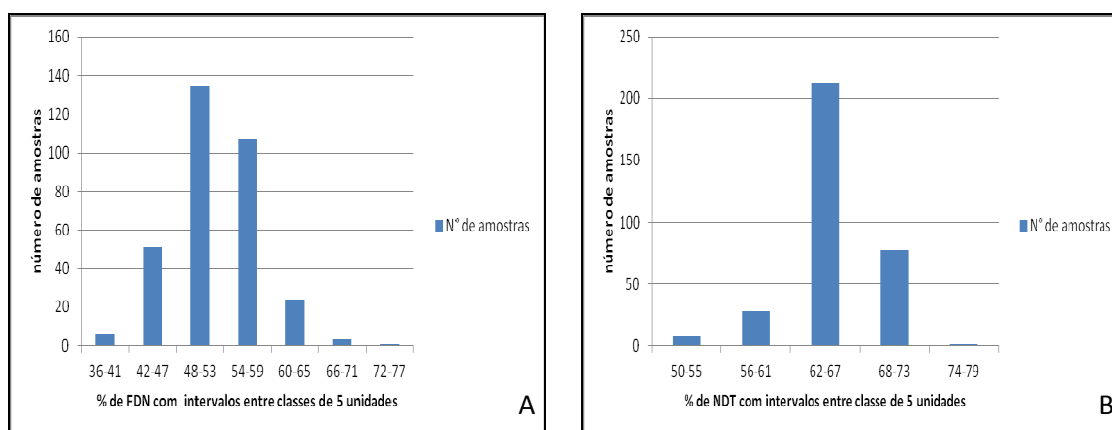


FIGURA 1 – A) Classificação das 327 amostras em classes de 5 unidades percentuais mostrando a concentração dos valores de FDN das silagens de milho. B) Classificação das 327 amostras divididas em classes de 5 unidades percentuais, mostrando a concentração dos valores de NDT das silagens de milho.

O teor médio de extrato etéreo verificado nas silagens (TABELA 3) está de acordo com os valores apresentados por Mizubuti et al. (2002), de 2,23% MS, que variaram entre 1,5 a 4,85%, diferença menor à observada no presente trabalho (0,83 a 4,88%). A variação encontrada nesse parâmetro bromatológico é decorrente dos diferentes híbridos comerciais utilizados nas propriedades e do crescimento de microrganismos espoliadores na silagem. Boyacoglu e Hettiarachchy (1995) observaram diminuição de até 43% no teor de lipídeos totais em amostras de trigo contaminadas com *Fusarium*. No entanto, nenhuma correlação entre extrato etéreo e IPM foi encontrada no presente trabalho ($r=0,07$; $P=0,19$), tampouco qualquer descrição na literatura associando essa fração a variações na concentração de micotoxinas em silagens de milho. Ono et al. (2006) correlacionaram a concentração de fumonisina e os teores de proteína e lipídios em grãos de milho. Os resultados mostraram correlações não significativas entre essas variáveis, concordando com os resultados encontrados neste trabalho.

O valor médio de Nutrientes Digestíveis Totais (NDT) encontrados neste levantamento (65,2%) está pouco abaixo dos relatados por Tine et al. (2001), de 69,5% e Velho et al. (2007) de 69,4%. Essa diferença pode ser atribuída aos menores teores de lignina (1,5 e 2,4%, respectivamente) nas silagens avaliadas por aqueles autores, lembrando que a lignificação é um fator que contabiliza negativamente a equação de NDT de Weiss et al. (1992). No entanto, os valores máximos de NDT foram menores que os encontrados no

presente trabalho, o que pode ser explicado pelo maior teor de extrato etéreo nos híbridos modernos de milho.

Os teores de lignina estiveram de acordo com os valores médios encontrados por Vilela et al. (2008), de 4,3%, porém pouco acima do que o NRC (2001) apresenta para silagem de milho (3,1% de lignina em silagens com 32 a 38% de MS), assim como os valores descritos por Tine et al. (2001) e Velho et al. (2009) de 1,5 e 2,4%, respectivamente. Entretanto, também foram observados valores extremamente altos em algumas silagens (superiores a 9%).

Embora parte das variações possa ser explicada pela composição genética do milho, as falhas durante o processo de ensilagem contribuem de forma marcante para alteração no valor nutritivo das silagens. Evidências constatadas neste levantamento indicam que alguns efeitos deletérios na silagem podem ser evitados, como mostra os QUADROS 2 e 3.

QUADRO 2 – NÚMERO DE PROPRIEDADES CLASSIFICADAS DE ACORDO COM O TAMANHO DE PARTÍCULA DA SILAGEM DE MILHO E O GRAU DE COMPACTAÇÃO DO SILO (N = 108)

		Compactação do silo ¹		TOTAL
		Adequada ²	Razoável a inadequada	
Tamanho de Partícula	Adequado	55 (46,7)	29 (37,3)	84
	Razoável	5 (9,4)	12 (7,6)	17
	Inadequado	0 (3,9)	7 (3,1)	7
	TOTAL	60	48	108

¹ Valores estatisticamente diferentes pelo teste do Qui-Quadrado ($P < 0,01$).

² Valores entre parênteses são frequências esperadas para teste do Qui-Quadrado.

No QUADRO 2 está apresentada a relação entre as variáveis “tamanho de partícula” e “compactação do silo”. As classes “razoável” e “inadequada” da variável “compactação do silo” foram agrupadas para enquadramento na tabela de contingência para análise de Qui-Quadrado.

Foi possível observar uma relação entre tamanho de partícula e compactação do silo. Quando as partículas apresentavam tamanho adequado, 65,5% dos silos avaliados apresentaram densidade de compactação adequada. Quando analisamos os silos que apresentavam tamanho de partícula razoável, apenas 29,4% apresentaram compactação adequada, enquanto 58,8% mostraram compactação razoável.

Nos silos em que o tamanho de partícula estava inadequado (3,1%), nenhum apresentou compactação adequada. Esses resultados demonstram que o tamanho de partícula influencia fortemente a compactação da silagem ($P < 0,001$). Em levantamento online, Bernardes (2012) questionou 236 técnicos sobre características das silagens produzidas nas propriedades assistidas por eles, e 11,4% admitiram que as partículas grandes e desuniformes predominavam nas silagens destas fazendas, ou seja, o número de propriedades que sofrem os impactos negativos da picagem pode ser ainda maior do que os observados neste trabalho.

Apesar da evidência de maior concentração de micotoxinas em áreas características de baixa compactação (topo do silo) feita por Cavallarin et al. (2004), neste levantamento o mesmo comportamento não foi constatado. A afirmação da obrigatoriedade da presença de oxigênio para o crescimento fúngico poderia ser utilizada para justificar a maior presença de micotoxinas nos silos que apresentaram baixa compactação, no entanto essa relação não foi verificada. Possivelmente a falta de ligação ocorreu pela alta porcentagem do IPM (91,8%, TABELA 5), ou seja, independentemente do nível de compactação da silagem a concentração e a presença de micotoxina não foi alterada.

Com relação à composição bromatológica, não foram encontrados grandes vínculos entre essas variáveis. O melhor coeficiente de correlação verificado foi entre PB e grau de compactação ($r = 0,22$). Devido à análise de campo ser subjetiva, a falta de relação entre a compactação e as demais variáveis bromatológicas pode ser justificada.

O QUADRO 3 apresenta a relação entre as variáveis “equipamento de colheita e picagem” e “tempo para fechamento do silo”. A colheita e picagem da forragem foi feita utilizando-se colhedora autopropelida (automotriz) ou ensiladeira de arrasto acoplada ao trator (1 ou 2 linhas).

QUADRO 3 – NÚMERO DE PROPRIEDADES CLASSIFICADAS DE ACORDO COM O EQUIPAMENTO DE COLHEITA E PICAGEM DO MILHO E QUANTO AO TEMPO PARA FECHAMENTO DO SILO (N = 108)

		Tempo para fechamento do silo ¹			TOTAL
		Até 1 dia ²	2 a 3 dias	>3 dias	
Equipamento de colheita	Ensiladeira Automotriz	12 (8,1)	14 (15)	4 (6,9)	30
	Ensiladeira de arrasto	17 (20,9)	40 (39)	21 (18,1)	78
	TOTAL	29	54	25	108

¹ Valores não significativos pelo teste de Qui-Quadrado. ² Valores entre parênteses são frequências esperadas para teste do Qui-Quadrado.

Apenas 30 das 108 propriedades utilizaram ensiladeira automotriz (27%), a grande maioria em Castro/PR, apontando a ainda baixa difusão dessas máquinas no Brasil. As variações numericamente observadas para tempo de fechamento do silo em relação ao equipamento de colheita não foram significativas ($P > 0,05$). A eficiência da colheita pela automotriz pode prejudicar a compactação do material em virtude do rápido abastecimento do silo, reduzindo o tempo de compactação por unidade de forragem que chega ao silo. Contudo, esta relação não foi observada ao se comparar as variáveis “equipamento de colheita” e “compactação do silo” (não ilustrado), o que demonstra que o proprietário que terceiriza a colheita do milho e usa automotriz está ciente da organização necessária à maior logística de compactação no silo. É importante que o fechamento do silo seja feito o mais rápido possível, para reduzir ao máximo o contato da forragem picada com o oxigênio; contudo, apenas 26% das propriedades realizaram o fechamento do silo em até 1 dia. Apesar de 74% das fazendas realizarem o fechamento do silo em período maior que um dia, essa variável não demonstrou alterar a concentração de micotoxinas na silagem. As propriedades que relataram longos períodos até o fechamento do silo não tiveram aumento na concentração, tampouco no tipo de micotoxina presente na silagem. No entanto, os maiores prejuízos podem ser gerados na qualidade bromatológica dessas silagens, onde o monitoramento desde a ensilagem até a abertura do silo poderia mostrar a consequência na demora do fechamento do silo.

A comparação entre as variáveis “acompanhamento técnico” e “uso de aditivo na silagem” é mostrada no QUADRO 4.

QUADRO 4 – NÚMERO DE PROPRIEDADES CLASSIFICADAS DE ACORDO COM USO DE ADITIVO NA SILAGEM DE MILHO E QUANTO À PRESENÇA DE ACOMPANHAMENTO TÉCNICO (N = 105)

		Acompanhamento técnico ¹		
		Sim ²	Não	TOTAL
Uso de aditivo	Sim	16 (13,1)	11 (13,9)	27
	Não	35 (37,9)	43 (40,1)	78
TOTAL		51	54	105

¹ Valores não significativos pelo teste de Qui-Quadrado.² Valores entre parênteses são frequências esperadas para teste do Qui-Quadrado.

Das 105 propriedades que responderam essa pergunta, 51 contavam com acompanhamento técnico, e destas, apenas 31,4% aplicaram aditivo microbiano na silagem. Dentre todas as propriedades, 74% não fizeram uso de quaisquer tipos de aditivo na ensilagem, demonstrando que essa tecnologia é pouco utilizada pelos produtores, até mesmo quando contam com serviço de assistência técnica. Cuidados nestas etapas podem melhorar significativamente a qualidade da silagem, evitando perdas de MS e de componentes nutricionais, tais como: proteínas, vitaminas, minerais e energia, acarretando elevação da fração fibrosa. A falta de relação entre a utilização de aditivo e ausência de micotoxina pode ser explicada pela baixa ação dos inoculantes em toxinas já sintetizadas, ou seja, aquelas provenientes da lavoura (Binder, 2000), uma vez que nesse levantamento ficou demonstrado que a maior parte das micotoxinas encontradas na silagem provavelmente surgiram na lavoura.

Nutricionalmente, a fração fibrosa (FDN) é um importante parâmetro de qualidade da silagem de milho devido principalmente à limitada degradabilidade ruminal deste componente. Embora vacas leiteiras tenham uma exigência de FDN para a máxima produtividade (Mertens, 1987), o elevado teor desse constituinte afeta negativamente a ingestão total de MS, em virtude da limitação física do rúmen, e também reduz a densidade energética da dieta. Os teores médios de FDN encontrados nas silagens estão de acordo com os relatados por Velho et al. (2007) de 53,5%, deve-se considerar que o material utilizado pelos autores foi proveniente de milho safrinha. Esse fato pode explicar parcialmente a variação no teor de FDN (98%) encontrada no presente trabalho, uma vez que das silagens coletadas 23,8% eram de milho safrinha. Foi possível observar silagens de excelente qualidade; 36,6% de FDN principalmente para dietas de rebanhos leiteiros especializados, por outro

lado silagens com valores de 72,7% foram encontradas. Essa observação nos remete a pensar que valores elevados da fração fibrosa estão relacionadas com a participação de grãos na silagem como demonstrado por Schmid et al. (1984), onde a maior quantidade de grãos na silagem reduz a porção fibra.

Na TABELA 4 estão apresentados os valores médios da composição bromatológica para cada região amostrada. Houve efeito significativo entre regiões para todas as variáveis.

As silagens da região de Castro apresentaram menor teor de PB entre as demais regiões. Provavelmente essa constatação esteja relacionada com o teor de MS da planta no momento do corte. A colheita antecipada do milho, com teor de MS próximo a 30% nessa região é proposital e está relacionada à tentativa de aumentar digestibilidade do amido, tendo em vista que os genótipos utilizados no Brasil são do tipo Flint, e que este possui menor degradabilidade do amido (Philippeau & Michalet-Doreau, 1998).

O teor médio de PB foi superior em Toledo/PR e SC, provavelmente relacionado à ampla utilização de adubação orgânica nessas lavouras. Os solos tropicais, de maneira geral, são deficientes em vários minerais orgânicos, inclusive nitrogênio. A constante aplicação de dejetos nas áreas utilizadas para o plantio do milho permite aumentar a concentração desse componente no solo e consequentemente reduzir a limitação para síntese de compostos nitrogenados.

As regiões de Toledo e do oeste de SC são reconhecidamente grandes produtores de aves e suínos, e contam com abundante disponibilidade de esterco desses animais, motivo pelo qual 33,4% das propriedades dessas regiões utilizavam este fertilizante como fonte de nitrogênio. Nenhuma das fazendas visitadas em Minas Gerais e Goiás faziam uso desse tipo de material. Em Castro, 53% utilizaram dejetos animais na lavoura, porém o impacto do incremento de N no teor de proteína da silagem não foi observado, possivelmente em razão da antecipação da colheita do milho como relatado anteriormente.

As silagens produzidas em Toledo (60 amostras) apresentaram os menores teores de FDN e FDA em relação às demais regiões, o que se justifica pelo alto teor de PB e NDT nas silagens dessa região. Contudo, essa relação não é verdadeira para SC, com alto valor de PB associado a alto teor de

componentes da parede celular, cujo efeito pode estar relacionado com menor produção de grãos ou perdas de carboidratos solúveis (CHOs) durante o processo fermentativo. Nessa região, o teor médio de MS foi de 30,9%, indicando que a planta foi colhida no tempo correto, não podendo ser atribuído ao estágio vegetativo o maior acúmulo de componentes estruturais.

TABELA 4 – MÉDIAS DA COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DAS SILAGENS DE MILHO AVALIADAS EM CINCO REGIÕES BRASILEIRAS

Variáveis	Região					Média	EPM
	Castro/PR	MG	GO	Toledo/PR	SC		
Matéria Seca, %	30,6b	33,8a	34,8a	33,3a	30,9b	32,6	0,27
Proteína bruta, %	6,3c	7,2b	6,9b	7,6a	7,8a	7,1	0,06
Extrato etéreo, %	2,7b	2,9a	2,5b	3,0a	3,0a	2,8	0,03
FDN, %	52,4a	53,1a	54,1a	49,4b	53,9a	52,2	0,30
FDA, %	27,4a	26,5a	26,4a	23,5b	27,1a	26,3	0,34
Lignina, %	4,3a	4,2ab	4,1ab	3,6c	3,8bc	4,0	0,07
NDT, %	64,9b	65,1b	64,6b	66,7a	65,3b	65,3	0,20
Cinzas, %	3,1c	3,3ab	3,2bc	3,4a	3,6a	3,3	0,06

1 Média seguida de letras diferentes, na linha, são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05)

2 Erro Padrão da Média

A análise conjunta das TABELAS 3 e 4 permite afirmar que silagens de milho são alimentos de composição bromatológica bastante variável, o que pode alterar fortemente o desempenho dos animais que consomem rações contendo esse volumoso, ou seja, o uso de valores tabulados para balanceamento de dietas pode levar a grandes erros de predição de consumo e desempenho. Phipps et al. (2000) observaram diferenças de até 5 kg/dia na produção de leite de vacas consumindo rações em mistura total com silagens do mesmo híbrido de milho que apresentavam diferentes teores de MS e FDN.

Apesar da grande abrangência de informações coletadas mediante questionário grande parte da variação detectada entre amostras das silagens não pôde ser totalmente esclarecida ou correlacionada a fatores de manejo e produção das silagens.

Na TABELA 5 estão apresentadas as médias com desvio padrão, a incidência, valores máximos e mínimos para as micotoxinas analisadas. A alta variabilidade nos valores detectados de micotoxinas pode ser verificada pelo alto desvio padrão e grande diferença entre os valores máximos e mínimos, para todas as toxinas avaliadas.

TABELA 5 – MÉDIAS DA CONCENTRAÇÃO DE MICOTOXINAS (ppb), INCIDÊNCIA E VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS DETECTADOS EM 327 AMOSTRAS DE SILAGEM DE MILHO DE CINCO REGIÕES BRASILEIRAS

Micotoxina ¹	Média ± DP ²	Incidência (%)	Mínimo	Máximo
IPM	0,025±0,08	91,8	0,001	0,47
AFB1	3 ± 3	0,92	1	6
ZEA	181 ± 278	72,8	10	1830
OTA	11 ± 13	6,1	2	62
DON	259 ± 124	33,6	140	648
F B1	369 ± 401	48,6	124	2310
F B2	261 ± 215	25,1	113	1380

¹ AFB1= Aflatoxinas B₁; ZEA= Zearalenona; OTA= Ocratoxina A; DON= Deoxinivalenol; F B1= Fumonisin B₁; F B2= Fumonisin B₂.

² Médias calculadas apenas das amostras que apresentaram valores detectáveis.

Não foi detectada a presença das aflatoxinas B2, G1 e G2 em quaisquer das amostras avaliadas. Apenas três (3) das 327 amostras coletadas apresentaram aflatoxina B1, resultado semelhante ao verificado por Aragón & Rodrigues (2009). Driehuis et al. (2008a), em levantamento de campo realizado na Holanda, não detectaram aflatoxinas nas silagens coletadas. Esses resultados indicam que silagens de milho podem ser consideradas de pouca relevância para a introdução de aflatoxinas na dieta de bovinos. Isso se deve à baixa tolerância do fungo *Aspergillus* a condições anaeróbias e a ambientes ácidos. No entanto, em silagens produzidas e armazenadas de maneira precária sua concentração pode alcançar níveis de 87 ppb (AFB1) (Cavallarin et al., 2004), sobretudo em regiões onde a temperatura ambiental fica em torno de 26-35°C associada com alta umidade (Amaral & Nussio, 2011), explicando o motivo pelo qual podem ser mais frequentes em baixas latitudes (Klich, 2002).

A baixa incidência de ocratoxina A verificada neste experimento (6,1%) concorda com os relatos apontados na literatura (Garon et al., 2006; Boudra et al., 2007; Driehuis et al., 2008a), sendo mais relacionada com outros alimentos que compõem a dieta que não a silagem. Contudo, o valor máximo verificado para OTA (62 ppb) pode ser considerado extremamente alto, indicando que em algumas condições muito específicas essa micotoxina pode ser de alto risco em silagens de milho.

A micotoxina de maior incidência foi a zearalenona (72,8%), sendo que 33 amostras (10,1%) apresentaram valores superiores a 285 ppb, nível que pode ser considerado crítico para silagens de milho. A concentração dessa

micotoxina em silagens de milho varia conforme a região, clima, época de plantio etc., e não há na literatura outras descrições de limites aceitáveis para silagens de milho.

Acosta Aragón & Rodrigues (2009), durante os anos de 2005 a 2008, analisaram micotoxinas em 538 amostras de silagem de milho provenientes de diversos países da Europa e Ásia. Os autores verificaram 23% e 48% de incidência de ZEA, respectivamente, com valores médios de 129 ppb e 1058 ppb, na mesma ordem. No presente levantamento foi encontrada concentração média de 181 ppb, muito próxima à citada por Driehuis et al. (2008a), de 146 ppb.

A Zearalenona é um metabólito produzido por várias espécies de *Fusarium*, principalmente *Fusarium graminearum*, frequentemente encontrado em milho, trigo, cevada, arroz, sorgo e silagens (Jouany & Diaz, 2005). A planta fica mais vulnerável ao ataque desse fungo quando há situação de estresse desencadeado por condições climáticas extremas (seca ou chuva), ataques de insetos, doenças ou danos físicos (Leslie et al., 1990; Teller et al., 2012). Seu desenvolvimento depende da temperatura (10-40°C), pH (entre 4 e 8) e atividade de água (acima de 0.7). No entanto, condições ideais para seu crescimento não são pré requisitos para formação de micotoxinas. Joffe (1986) observou uma boa taxa de crescimento de *Fusarium* em temperatura entre 25-30°C sem produção expressiva de toxina. Porém, quando o fungo foi submetido a temperaturas próximas a 0°C, grande quantidade de zearalenona foi detectada. Essa observação é condizente com os resultados encontrados neste ensaio.

As amostras colhidas em Castro/PR e SC mostraram as maiores incidências de ZEA (TABELA 6), provavelmente em função da variação de temperatura diurna e noturna nessas regiões. O estresse térmico pode ter contribuído para a produção de ZEA durante a condução da lavoura, bem como na face exposta do silo.

Nos animais, segundo Coulombe Jr. (1993), a ZEA está associada a problemas reprodutivos, por conta do seu efeito hiperestrogênico, causando redução na concepção, abortos, vaginite e aumento da glândula mamária de novilhas. Esses problemas são causados pela ligação da ZEA e seus derivados

nos receptores estrogênicos, levando a desordens reprodutivas (Diekman e Green, 1992).

Não existem níveis de ingestão diária de ZEA que sejam considerados seguros para ruminantes, devido ao uso de diferentes fontes de alimentos na dieta com diferentes micotoxinas, o que resulta em diferentes concentrações e combinações com diferentes níveis de toxicidade.

Brouk et al. (2011), estudando o desempenho produtivo de vacas em lactação recebendo silagens de milho transgênico e não transgênico, não perceberam efeito sobre parâmetros produtivos entre as dietas. Neste mesmo estudo a análise micotoxicológica mostrou que não houve diferença na concentração de ZEA entre os híbridos (632 ppb na silagem do milho transgênico contra 648 ppb para a silagem do convencional). É difícil estabelecer a relação entre a incidência de micotoxinas e as variáveis envolvidas no processo de ensilagem. Propriedades com excelentes práticas de manejo apresentaram alta ocorrência de ZEA, indicando que o fator climático durante a condução da cultura tem grande importância na produção das micotoxinas. Garon et al. (2006) detectaram níveis entre 23 e 41 ppb de ZEA em silagens de milho durante o período de utilização do silo, que compreendeu de setembro a maio na França. Eppeley et al. (1974) analisaram amostras de milho oriundas de plantas atacadas por *Fusarium* (podridão de colmo) que continham alta umidade e encontram níveis de ZEA de 0,4 a 5 ppm, corroborando que o fator climático e o manejo de colheita durante a condução da cultura pode ter impacto direto na detecção de micotoxinas na silagem.

Apenas 15 amostras apresentaram valores de FB1 e FB2 superiores ao limite estabelecido de 1000 ppb. Apesar de vários estudos mostrarem que os ruminantes são tolerantes a altas doses de fumonisinas (Prelusky et al., 1995; Maragos & Richard, 1994), as concentrações encontradas não representam risco à saúde dos animais, segundo esses estudos.

As fumonisinas são produzidas pelas cepas de *Fusarium moliniforme* e *F. proliferatum*. A ocorrência das fumonisinas em alimentos tem sido relacionada a ataques que acontecem na planta quando esta ainda está na lavoura, podendo ser produzida durante o armazenamento se a vedação do silo não for eficiente (Fink-Gremmels, 2005). González-Pereyra et al. (2008) verificaram aumento na concentração de fumonisina após a fermentação. No

momento da ensilagem o material apresentou nível médio de 600 ppb para FB1. Após o processo fermentativo a concentração aumentou para 1110 ppb. Esse efeito foi atribuído à variação encontrada nas propriedades físicas da silagem, principalmente ao pH. Apesar da amplitude de informações coletadas no presente ensaio não foi possível encontrar quais fatores determinam a presença e o aumento na concentração de fumonisinas nas silagens.

A maioria dos fungos não se desenvolve durante a fase anaeróbica da ensilagem devido à baixa tolerância ao ambiente ácido e sem oxigênio (McDonald et al., 1991). Logo, a produção de micotoxinas durante a fase de fermentação pode ser considerada baixa ou nula. No entanto, Gardiner et al. (2009) demonstraram que o baixo pH associado à presença de amins pode promover um aumento significativo na produção de DON por *Fusarium graminearum*. Essa evidência converge com estudo realizado por Teller et al. (2012), que verificaram aumento na concentração das toxinas de *Fusarium* depois da ensilagem. A atividade patogênica do fungo pode permanecer mesmo após o processo fermentativo, sobretudo em aéreas sob influência da deterioração aeróbia (Cavallarin et al., 2004).

Avaliando 47 amostras de silagens na Holanda, Driehuis et al. (2008a) observaram concentração média de 550 ppb para DON com incidência de 53%. Em outra revisão, Driehuis (2011) compilou resultados de pesquisas sobre a ocorrência de DON em silagens de milho na Europa e nos Estados Unidos entre 1989 e 2007. Os dados mostraram que a incidência foi de 72 a 100% e a concentração média variou entre 600 e 1850 ppb, respectivamente. No presente estudo a concentração média de DON foi de 259 ppb, com incidência de 33,6%, variando entre 140 e 648 ppb. Esses resultados mostram a dificuldade na comparação entre trabalhos e na determinação dos valores aceitáveis para silagens de milho, indicando caráter regional na ocorrência de deoxinivalenol decorrentes de fatores relacionados ao clima, híbridos de milho e tratos culturais adotados na condução da lavoura. Essa variabilidade é observada ao se comparar as regiões do Brasil (TABELA 6). Contudo, a falta de trabalhos que adotam protocolos experimentais e/ou metodologias de análises micotoxicológicas, sobretudo com dados brasileiros, impede a comparação de forma abrangente dos resultados obtidos.

TABELA 6 – VALOR MÉDIO (ppb) E INCIDÊNCIA (NO POSITIVAS/TOTAL) DE MICOTOXINAS NAS REGIÕES AMOSTRADAS

Região	AFB1	ZEA	OTA	DON	F B1	F B2
Castro/PR	4 (2/96)	334 (96/96)	4 (5/96)	208 (7/96)	316 (42/96)	199 (15/96)
Toledo/PR	-	75 (34/60)	5 (1/60)	276 (30/60)	273 (31/60)	209 (19/60)
GO	-	48 (14/42)	11(1/42)	221 (12/42)	201 (11/42)	143 (5/42)
MG	-	76 (44/69)	15 (6/69)	264 (36/69)	567 (48/69)	352 (32/69)
SC	1 (1/60)	92 (49/60)	12 (7/60)	264 (25/60)	277 (27/60)	226 (11/60)

AFB1= Aflatoxinas B₁; ZEA= Zearalenona; OTA= Ocratoxina A; DON= Deoxinivalenol; F B1= Fumonisin B₁; F B2= Fumonisin B₂.

A relação entre manejo do painel do silo e incidência de micotoxinas nas silagens ainda não está consagrada na comunidade científica, pois a fase de crescimento da planta na lavoura, anterior ao processo de ensilagem, também apresenta forte ligação com o conteúdo de micotoxinas na silagem. No presente ensaio, silos com excelentes características de manejo também apresentaram níveis elevados de toxinas, mesmo sem áreas definidas de aquecimento no painel.

Foi verificado coeficiente de correlação negativo e de baixa magnitude entre temperatura e IPM. A TABELA 7 apresenta os coeficientes de correlação entre as temperaturas dos pontos de amostragens (interna e externa), concentração de micotoxina (IPM), intervalo de tempo da última retirada e composição bromatológica.

TABELA 7 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÕES (*valores de r*, **valores de P**) ENTRE IPM, TEMPERATURAS DOS PONTOS NO PAINEL DO SILO, TEMPO DA ÚLTIMA RETIRADA E COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DAS SILAGENS

	¹ IPM	TempExt	TempInt	EE	MS	Tempretirada
IPM		-0,20	-0,10	0,07	0,24	0,02
TempExt	<0,01		0,36	0,13	0,08	-0,13
TempInt	0,07	<0,01		-0,12	0,12	0,01
EE	0,19	0,02	0,02		0,37	0,03
MS	0,01	0,08	0,02	<0,01		-0,16
Tempretirada	0,68	0,02	0,79	0,57	0,10	

¹IPM – Índice Ponderal de Micotoxinas; TempExt – temperatura externa do ponto amostrado no painel do silo; TempInt – temperatura interna do ponto amostrado no painel do silo; TempAmb – temperatura ambiente no momento da coleta. TempExt – temperatura da superfície do ponto amostrado; TempInt – temperatura interna (15 cm) do ponto amostrado; Tempamb – temperatura ambiente. Tempretirada - intervalo de tempo entre a última retirada da silagem do silo e a avaliação

A temperatura do painel do silo não foi um bom indicador da presença de micotoxina, pois a correlação entre a TempExt e o IPM apresentou coeficiente negativo e de baixa magnitude ($r = -0,20$) e apesar de haver significância ($P < 0,01$) não é possível afirmar que a TIV pode ser considerada com uma ferramenta eficiente na predição da concentração de toxinas. Esses resultados indicam que a hipótese de que a concentração de micotoxinas nos locais quentes do painel do silo, em função da competição entre os microrganismos e também pela rápida variação da temperatura, não é verdadeira.

Houve baixa correlação entre a temperatura do painel e a presença das micotoxinas estudadas como pode ser visualizado nas FIGURAS 2 e 3.

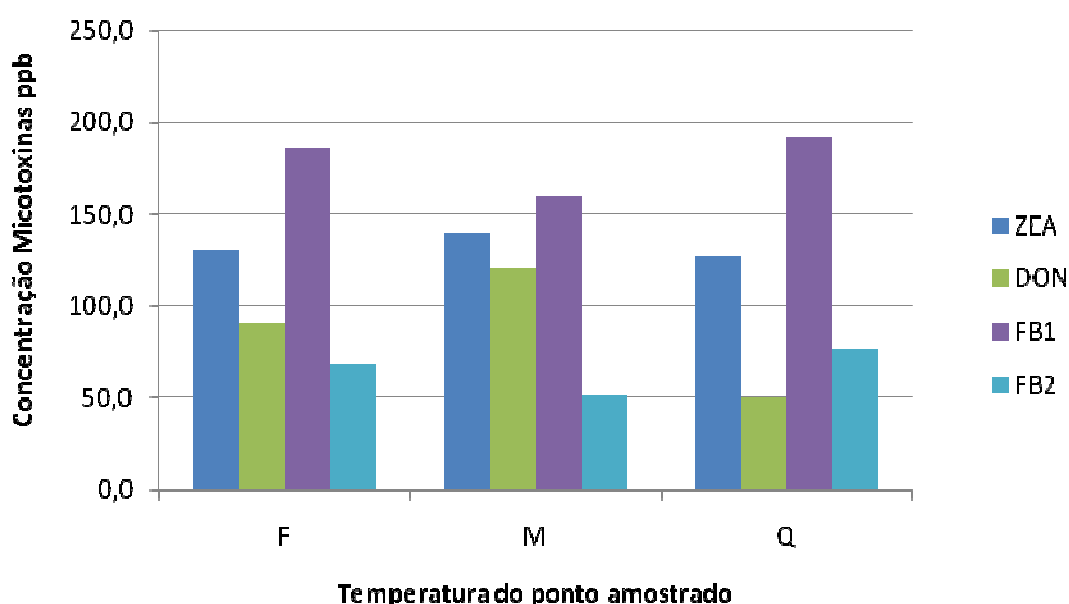


FIGURA 2 – Concentração de micotoxinas (ppb) em relação a temperatura do painel do silo de 109 fazendas amostras no Brasil (F= ponto de temperatura fria, M= ponto de temperatura média, Q= ponto de temperatura quente). A OTA não foi considerada no gráfico pela baixa incidência.

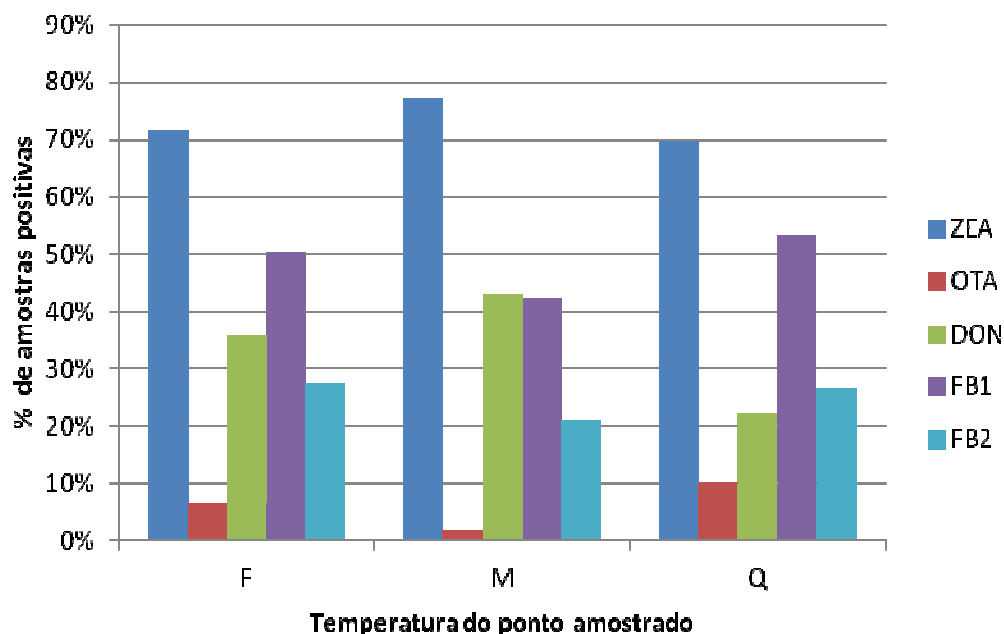


FIGURA 3 – Porcentagem de amostras positivas nos diferentes pontos de aquecimento de 109 silos amostrados no Brasil (F= ponto de temperatura fria, M= ponto de temperatura média, Q= ponto de temperatura quente).

O modelo de regressão estudado (TABELA 8) mostra que o calor no painel foi significativamente relacionado com a presença de OTA e DON ($P < 0,02$ e $P < 0,001$) e sem efeito para as demais micotoxinas.

Na TABELA 8 pode-se observar que a probabilidade de OTA ser encontrada no ponto quente do painel foi maior que na temperatura média, porém, semelhante ao ponto frio. Esse achado vai de encontro à hipótese inicial desse trabalho e aparentemente não tem explicação biológica. É arriscado atribuir esse resultado ao efeito da temperatura devido principalmente à baixa incidência dessa toxina (6,1%), e qualquer conclusão sobre esses dados poderia ser tendenciosa.

Palacios-Cabrera et al. (2005) demonstraram que não houve crescimento do fungo produtor de OTA quando a temperatura estava próxima de 8°C, todavia, a colonização foi acelerada em temperatura entre 25 e 30°C. Essas informações permitem afirmar que esse comportamento não foi observado no presente trabalho, em virtude da ausência de efeito entre regiões para essa micotoxina. Porém, a baixa incidência (6%) e elevado desvio padrão dificultam a correlação dessa micotoxina com as demais variáveis estudadas.

TABELA 8 – RESULTADO DA REGRESSÃO MÚLTIPLA LOGÍSTICA APRESENTANDO *ADJUSTED ODDS RATIO* (AOR) (RAZÃO DE PROBABILIDADE AJUSTADA) DE MICOTOXINAS EM REGIÃO E TEMPERATURA. INTERVALOS DE CONFIANÇA 95% ESTÃO ENTRE PARÊNTESES (95%).

Variáveis independentes		Micotoxina									
		OTA		FB1		FB2		DON		ZEA	
		AOR	P-value ¹	AOR	P-value	AOR	P-value	AOR	P-value	AOR	P-value
	Toledo ²		n.s. ³		<0,001		<0,0001		<0,0001		<0,0001
Região	Castro			0,72 (0,37-1,4)		0,40 (0,18-0,86)		0,07 (0,02-0,18)		5,92 (0-infinito)	
	Goiás			0,33 (0,14-0,77)		0,29 (0,09-0,85)		0,38 (0,16-0,90)		0,42 (0,18-0,95)	
	Minas			2,15 (1,04-4,44)		1,87 (0,91-3,86)		1,09 (0,53-2,23)		1,35 (0,66-2,75)	
	SC			0,76 (0,37-1,57)		0,48 (0,20-1,13)		0,70 (0,33-1,47)		3,44 (1,49-7,92)	
Temperatura	Fria ⁴		0,02		ns		n.s		0,001		n.s
	Média	0,26 (0,05-1,33)						1,46 (0,80-2,67)			
	Quente	1,66 (0,60-4,52)						0,45 (0,24-0,87)			

1 P-value obtido pelo teste Qui-quadrado.

2 Região usada como referência.

3 Não significativo (P > 0.05) Qui-Quadrado.

4 Temperatura usada como referência.

Efeito significativo de temperatura também foi observado para DON, onde a probabilidade de presença dessa toxina no ponto frio foi maior em relação ao ponto quente. Possivelmente esse efeito indique que o DON não seja produzido na silagem. A presença desta e outras *Fusarium* toxinas (zearalenona, fumonisinas e DON) está relacionada com a contaminação da planta pelo fungo no campo via espiga, folhas, caule ou ainda sementes. Teller et al. (2012) demonstraram diferença estatística na concentração de DON em silagens de milho produzidas com plantas saudáveis ou danificadas. Os níveis médios encontrados entre as silagens foram de 920 ppm contra 3,12 ppm, respectivamente, demonstrando que o dano causado na planta, seja mecânico ou por ataque de pragas, pode aumentar o risco de infecção pelo fungo e consequentemente o nível de toxinas. Os níveis encontrados por esses autores foram até dez vezes maiores que os encontrados neste trabalho. No presente ensaio não foi verificada correlação significativa entre os relatos de problemas com pragas na lavoura e a concentração dessa micotoxina, porém, foi verificado efeito de região, onde a probabilidade de ocorrência de DON foi maior em Minas Gerais e menor em Castro. Dessa forma, quando comparamos Castro, Goiás e Santa Catarina com Toledo, a probabilidade de presença de DON foi sempre maior nesta última.

Para fumonisinas foram observados comportamentos semelhantes e co-ocorrência. A probabilidade de detecção de FB B1 e B2 não foi significativamente relacionada à temperatura. Por outro lado, foi observada diferença estatística para região ($P < 0.001$) para as duas toxinas.

As propriedades visitadas no Estado de Minas Gerais tiveram maior chance de detecção de fumonisinas B1 e B2. Essa informação sugere infestações de espécies patogênicas de *Fusarium* nas lavouras de milho dessa região. Essa afirmação é reforçada pela maior presença de DON, outra toxina produzida por espécie de *Fusarium*. Muito embora somente a presença do fungo não seja fator determinante para a produção de micotoxinas em silagens, deve-se considerar que características intrínsecas da região, não identificadas neste trabalho, podem ter favorecido esses achados.

Em trabalho recente, Keller et al. (2012) realizaram levantamento da ocorrência do fungo *A. fumigatus* em silagens de milho, sorgo e cevada úmida em fazendas de São Paulo e Rio de Janeiro. Os autores mostraram alta contagem de fungos (1×10^4 UFC/g) nas silagens, com prevalência de *Aspegillus* sp., porém apenas a gliotoxina foi avaliada.

Assim, as informações contidas nesse trabalho demonstram a alta variabilidade na composição bromatológica e micotoxicológica de silagens de milho. O grande número de variáveis estudadas permite inferir que um número incomensurável de fatores interfere nesses parâmetros, impossibilitando as determinações de correlações significativas de variáveis qualitativas da silagem com a temperatura no painel, práticas de manejo dos silos, tipos de silo, manejo agrônomo na condução da cultura do milho, entre outros. Novos estudos de levantamento no campo deverão ser mais restritivos no intuito de reduzir a variabilidade ambiental nas propriedades amostradas.

5 CONCLUSÃO

A TIV é uma ferramenta com grande potencial para determinação da variabilidade na temperatura das silagens. Porém a temperatura no painel do silo, de forma isolada, é uma variável sem correlação com parâmetros qualitativos e presença de micotoxinas nas silagens de milho.

A composição bromatológica de silagens de milho no campo apresenta grande variação e resultados tabelados não devem ser usados para formulação de dietas.

A incidência e a concentração de micotoxinas em silagens de milho são variáveis, no entanto, os níveis médios são baixos, não caracterizando a silagem de milho como uma fonte importante de introdução de micotoxinas na dieta dos animais, muito embora o monitoramento dessas substâncias deva ser constante, especialmente para as zearalenona e fumonisinas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O monitoramento da qualidade da silagem deve ser prática rotineira nas propriedades que esperam melhorar seus índices produtivos, visto que muitas perdas ocorrem durante o processo de produção e utilização da silagem.

Para isso métodos de análise de forragens na fazenda devem ser desenvolvidos, onde as informações geradas poderão contribuir para tomadas de decisão com maior segurança. O desenvolvimento de tecnologias no monitoramento da qualidade da silagem antes do fornecimento aos animais podem ajudar nos ajustes adequados das dietas, possibilitando correções nos teores de fibra, proteína e matéria seca, maximizando o uso dos ingredientes da dieta. No aspecto sanitário, técnicas que permitem respostas rápidas sobre a presença de substâncias tóxicas, podem ser usadas como monitoramento preventivo evitando assim que os animais sejam afetados por doenças que levam a queda na produtividade.

Levantamentos futuros devem incluir a avaliação de outras toxinas produzidas por fungos *Aspergillus fumigatus*, *Monascus ruber* e *Penicillium roqueforti* que possivelmente estejam mais correlacionadas à temperatura da silagem.

Ajustes na metodologia apresentada neste trabalho são necessários para avaliações a campo, pois fatores ambientais exercem grande influência no objeto avaliado, podendo causar interferência na captação de imagem pela câmera.

REFERÊNCIAS

- ABDELHADI, P.A.; SARAIVA, W.R.; BAMEIX, C.A. et al. Infrared thermography to assess the relationship between corn silage quality and face temperature. **Journal of Dairy Science**. v. 95, suppl. 2, p.537, 2012.
- ADESOGAN, A.T., KRUEGER, N.A.; SALAWU, M.B. et al. The influence of treatment with dual purpose inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of bermudagrass. **Journal of Dairy Science**. v.87, p.3407-3416, 2004.
- ADESOGAN, A.T., QUEIROZ, O.C.M. Silage pathogenicity and implications for the ruminant production chain. In: I International Symposium on Forage Quality and Conservation: 1., São Pedro, 2009. **Proceeding...** Piracicaba: FEALQ, 2009, p.225 -240.
- AGARWAL, A.; LLOYD, K.N.; DOVEY, P: Thermography of the spine and sacroiliac joints in spondylitis. **Rheumatol Phys Medicine**. v. 10, p.349-55, 1970.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. John Wiley e Sons, INC, New York. 4th ed., 1996, p.869
- ASSOCIATION OF CHEMICAL ANALYTICAL CHEMYSTRY – AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. v. 16th Ed., 4 th. Rev., Gaithersburg, MD. 1998. Method 985.18.
- ASSOCIATION OF CHEMICAL ANALYTICAL CHEMYSTRY – AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. v. 1 e 2. 17º ed. AOAC International, Gaithersburg, MD. 2000.
- ARAGÓN, Y.A. RODRIGUES, I. The occurrence of mycotoxins in silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, Madison, 2009. **Proceedings...** Madison: ISC, 2009, p.201-202.
- AMARAL, R.C. NUSSIO, L.G. Fungos e micotoxinas em silagens. In: Anais do IV Simpósio de Produção e Utilização de Forragens Conservadas, 4, Maringá, 2011. **Anais...** Maringá: Sthampa, 2011, p.221-249
- AMARAL, R.C.; NUSSIO, L.G.; ZOPOLLATO, M.; GOULARD, R.S.; et al. Lower temperature profile and less aflatoxin on corn silage covered by oxygen barrier plastic film. **Advances in Animal Bioscience**, v.1, p.469-470, 2010.
- BALIEIRO, G.N.; BRANCO, R.B.F.; CIVIDANTES, T.M.S.; et al. Relação custo benefício na produção de silagem com milho *Bt*. In: Anais do IV Simpósio de Produção e Utilização de Forragens Conservadas, 4, Maringá, 2011. **Anais...** Maringá: Sthampa, 2011. p.131-172.

- BAKAN, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D.; and CAHAGNER, B.; Fungal grown and Fusarium mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. **Journal Agriculture Food Chemical**. v. 50, suppl. 4, p.728-731, 2002.
- BATISTA JUNIOR, C.B.; ALBINO, U.B.; MARTINES, A.M.; et al. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, n. 8, p.1189-1194. 2002.
- BERNARDES, T.F. Ebook, Levantamento das práticas de produção e uso de silagens em fazendas leiteiras no Brasil. Disponível em <http://www.tfbernardes.com/index.php/ebook> Acessado em 10 de mar. 2013.
- BERZ, R.; SAUER, R.H.; The medical use of Infrared-Thermography history and recent application. **Thermografie Kolloquium**. Stuttgart. 2007.
- BINDER, E.M.; Heidler, D.; Schatzmayr, G.; Thimm, N.; et al. Microbial detoxification of mycotoxins in animal feed. In X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins: 10th., Guarujá, 2000. **Proceedings...** São Paulo: 2000, 21-25.
- BOUDRA, H.; BARNOUIN, J.; DRAGACCI, S.; MORGAVI, D.P.; Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. **Journal of Dairy Science**. v. 90, n. 7, p.3197-3201, 2007.
- BOYACLOGLU, D.; HETTIARACHCHY, N. S.; Changes in some biochemical components of wheat grain that was infected with *Fusarium graminearum*. **Journal of Cereal Science**. v. 21, p.57-62, 1995.
- BROUK, M.J.; CVETKOVIC, B.; RICE, D.W.; et al. Performance of lactating dairy cows fed as whole plant silage and grain produced from genetically modified corn containing event DAS-59122-7 compared to a nontransgenic, near-isogenic control. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p.1961-1966, 2011.
- CALSAMIGLIA, S.; HERNANDEZ, G.F.; HARTNELL, G. and PHIPPS, R.; Effects of corn silage derived from a genetically modified variety containing two transgenes on feed intake, milk production, and composition, and the absence of detectable transgenic deoxyribonucleic acid in milk in holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p.4718-4723, 2007.
- CALVO, A.M.; WILSON, R.A.; BOK, J. W.; KEELR, N.P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, n. 3, p.447-459, 2002.
- CAVALLARIN, L.; BORREANI, G., and TABACCO, E.; Mycotoxin occurrence in farm maize silages in northern Italy. In: 20th General Meeting of the European Grassland Federation, 21-24 June 2004, Luzern, Switzerland, **Proceeding...** Luzern, Switzerland, 2004, p.1023-1025, 2004.

- CHAEERLE, L.; CAENEGHEM, W.V.; MESSENS, E.; et al. Pre-symptomatic visualization of plant-virus interactions by thermography. **Nature Biotechnology**. v.17, p.813-816, 1999.
- COULOMBE Jr, R.A.; Biological action of mycotoxins. **Journal of Dairy Science**. v.76, p.880-891. 1993.
- COLYN, J.J.; SCHAEFER, J.A.; BASARAB, E.K.; et al. Prediction of residual feed intake in beef heifers by infrared thermography. **Journal of Dairy Science**. v.93, Suppl. 1, 2010.
- DÍAZ-ROYÓN, F.; GARCÍA, A.; KALSCHEUR, K. F.; et al. Occurrence and concentration of mycotoxins, molds and yeasts on corn co-products from South Dakota and Minnesota dairy farms. **Journal of Dairy Science**.
- DIEKMAN, M.A. GREEN, M.L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**. v.70, p.1615-1627. 1992.
- DIGMAN, M.F. and SHINNERS, K.J. Near infrared reflectance spectroscopy for management and utilization of forage In: II International Symposium on Forage Quality and Conservation: 2., São Pedro, 2011. **Proceeding...** Piracicaba: FEALQ, 2011, p.165 -182.
- DOWD, P.; Biotic and abiotic factors limiting efficacy of Bt corn in indirectly reducing mycotoxin levels in commercial fields. **Journal of Economic Entomology**. v.94 (5). p. 1067-1074, 2001
- DRIEHUIS, F.; SPANJER, M.C.; SCHOLTEN, J.M. et al. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. **Journal of Dairy Science**. v.91, n.11, p.4261- 4271, 2008a.
- DRIEHUIS, F.; SPANJER, M.C.; SCHOLTEN, J.M.; and TE GIFFEL, M.C.; Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. **Food Additives e Contaminants**. v.1, p.41-50, 2008b.
- DRIEHUIS, F.; Occurrence of mycotoxins in silage In: II International Symposium on Forage Quality and Conservation: 2., São Pedro, 2011. **Proceeding...** Piracicaba: FEALQ, 2011 p.85 -103.
- EDDY, A.L.; HOOGMOED, L. M.; SNYDER J.R.; Review: The role of thermography in the management of equine lameness. **The Veterinarian Journal**. v. 162, p.172-181. 2001.
- EDWARDS, S.G. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecenes mycotoxins. **Toxicology Letters** v. 153, p. 29-25, 2004.

- EPPLEY, R.M.; ATOLLOFF, L.; TRUCKSESS, M.W.; CHUNG, C.W.; Survey of corn for *Fusarium* toxins. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v.57, p.632-635, 1974.
- FAO, The Food and Agriculture Organization of the United Nations [2003]. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. disponível em: < <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499e/y5499e00.pdf>>. Acesso em Março, 12, 2013.
- FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal Applied Microbiology**. v.97, p.818-821, 2004.
- FINK-GREMMELS, J.; Mycotoxins in forages. **Mycotoxins Blue Book**. Nottingham University Press, p.249-268, 2005.
- FOX, L.M.; HOWLETT, B.; Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**. v.11, p.481-487, 2008.
- GARDINER, M. DONALD; OSBORNE, S.; KAZAN, KEMAL and MANNERS, J. M.; Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. **Microbiology**. v.155, p.3149-3156, 2009.
- GARON, D.; RICHARD, E., SAGE, L.; et al.; Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage experimental study. **Journal Agriculture Food Chemical**. v.54, p.3479-3484, 2006.
- GONZÁLEZ-PEREYRA, M.L., ALONSO, V.A., SAGER, R. et al. Fungi and select mycotoxins from-pre and postfermented corn silage. **Journal of Applied Microbiology**. v.104, p.1034-1041. 2008.
- GRUNER, K. **Principles of non-contact temperature measurement Raytek publication**. Retrieved November 20, 2002 disponível em: <http://www.raytek.com>. Acesso em Jan. 04, 2012.
- GUTIERREZ-CORREA, M. and TENDERDY, R. P. Production of cellulose on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**. v.19, p.665-667, 1997.
- HAMMOND, B.G.; CAMPBELL, K. W.; PILCHER C. D.; et al. Lower fumonisin mycotoxin level in the grain of Bt corn grown in the United State in 2000-2002. **Journal of Agriculture Food Chemical**. v. 52, n.5, p.1390-1397, 2004.
- HOLDEN, A.N.G. **Some effects of silage inoculants on aerobic stability**. PhD Thesis, University of Newcastle upon Tyne, UK. 1987.

- HOLDEN, L.A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**. v.82, n.8, p.1791-1794, 1999.
- JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre. Artmed, 2005, p.635-709.
- JOFFE, A.Z.; **Fusarium Species: Their Biology and Toxicology**. John Wiley and Sons, Inc., New York. 1986, p.588.
- JOUANY, J-P., and DIAZ, D. Effects of mycotoxins in ruminants. **Mycotoxins Blue Book**. Nottingham University Press, p. 295-320, 2005.
- JONSSON, A.; PAHLOW, G. Systematic classification and biochemical characterization of yeast growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* culture. **Animal Research and Development**. v.20, p. 7-22, 1984.
- JONSSON, A. Growth of *Clostridium tyrobutyricum* during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 54, p.557–568, 1991.
- JUNGES, D.; **Aditivo microbiano na silagem de milho em diferentes tempos de armazenamento e avaliação da estabilidade aeróbia por termografia em infravermelho**. 2010, 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária.
- KELLER, L.A.M.; KELLER, K.M.; MONGE, M.P.; et al. Gliotoxin contamination in and pre- and postfermented corn, sorghum and wet brewer's grain silage in Sao Paulo and Rio de Janeiro State Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. v. 112, p. 865-873, 2012.
- KIESSLING, K.H.; PETTERSSON, H.; SANDHOLM, K.; and OLSEN, M.; Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. **Applied and environmental Microbiology**. v.47, p.1070:1073, 1984
- KNÍZKOVÁ, L.; KUNC, P.; KOUBKOVÁ, M.; Evaluation of naturally ventilated dairy barn management by a thermographic method. **Livestock Production Science**. v.77, p. 349-353, 2002.
- KLICH, M.; Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**. v. 94, p. 21-27. 2002.
- KRIEG, N.R.; and HOLT, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology. **Williams and Wilkins**. Baltimore. v.1, 1984.

- KUNG Jr., L.; ROBINSON, J.R.; RANJIT, N.K. et al. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1479-1486, 2000.
- KUNG Jr., L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W. et al. Added ammonia or microbial inoculate for fermentation and nitrogenous compounds of alfafa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**. v.67, p.299-306, 1984.
- LEONEL, F.P.; PEREIRA, J.C.; COSTA, M.G.; et al. Consórcio capim-braquiária e milho: comportamento produtivo dos culturas e características nutricionais e qualitativas das silagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 38, n. 1, p.166-176, 2009.
- LESLIE, J.F.; PEARSON, C. A.S.; NELSON, P.E.; et al.; Fusarium ssp. From corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. **Phytopathology**, v.80, p.343-350, 1990.
- LI, Y.; NISHINO, N. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability, and microbial communities in whole crop corn silage. **Grassland Science**. v.57, 4, p.184-191, 2011.
- LIN, C.; BOLSEN K.K.; BRENT, B.E.; and FUNG, D.Y.C. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, p.375–387, 1992.
- LINDGREN, S.; PETTERSSON, K.; KASPERSSON, A.; JONSSON AND LINGVALL. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silage. **Journal Science Food Agriculture**. v. 36, p.765-774, 1985.
- MAGALHÃES, P.C.; DURAES, F.O.M.; CARNEIRO, N.P. et al. **Fisiologia do Milho**. Embrapa milho e sorgo. Minas Gerais, MG, Circular técnico, n. 22, p. 65, 2002.
- MAGALHÃES, A.L.R.; CAMPOS, J.M.S.; VALADARES FILHO, S.C.; et al. Cana-de-açúcar em Substituição à silagem de milho em dietas para vacas em lactação: Desempenho e viabilidade econômica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.5, p.1292-1302. 2004.
- MARAGOS, C. M.; RICHARD, J. L.; Quantitation and stability of fumonisins B1 e B2 in milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v.77, n. 5: 1162-1167. 1994.
- McDONALD, P., and WHITTENBURY, R.; The ensilage process. In: G. W. Butler and Bailey (ed) **Chemistry and Biochemistry of Herbage**. Academic Press. New York. v.3, p. 33-60. 1973.

- McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The Biochemistry of Silage**. 2.ed. Marlow Bucks, UK: Chalcombe Publications, 1991, 340p.
- McKENZIE, K.S.; **Degradation and detoxification of common chemical contaminants of food and water using ozone generated by electrolysis**. 1997. 200f. 1997 [Dissertation]. College Station, TX: Texa A&M University.
- MERTENS, D.R.; Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **Journal of Animal Science**.v.64, p.1548-1558. 1987.
- MIDDELHOVEN, W.J.; The yeast flora of maize silage. **Food Technology Biotechnology** v.36, p.7-11, 1998.
- MIOTELLO, S.; STELLETTA, C.; SIMONETTO, A.; CECCHINATO, R. et al. Infrared thermography A suitable technique to evaluate the quality of corn silage after the fermentation process. In: 60th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. Barcelona, Spain. p.4692, 2009.
- MIZUBUTI, I.Y.; RIBEIRO, E.A. L.; ROCHA, M.A.; et al. Consumo e digestibilidade aparente de silagens de milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e Girassol (*Heliantus Annuus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 267-272, 2002.
- MOON, N.J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, p.453-460, 1983.
- MONTANHOLI, Y.R.; ODONGO, N.E.; SWANSON, K.S.; et al. Application of infrared thermography as an indicator of heat and methane production and its use in the study of skin temperature in response to physiological events in dairy cattle (*Bos taurus*). **Journal of Thermal Biology**. v. 33, p.468-475, 2008.
- MUNKVOLD, G.P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, 109, p.705-713, 2003.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrients requirements of dairy cattle. 17th. Ed. Washington: **National Academy of Science**, p.408. 2001.
- NEUMANN, M. **Efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho (*Zea mays* L.) sobre perdas, valor nutritivo de silagens e desempenho de novilhos confinados**. 2006, 203f. tese (Doutorado em Zootecnia) – Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- NISHINO, N. Aerobic stability and instability of silage caused by bacteria. In: II International Symposium on forage Quality and Conservation: 2., São Pedro, 2011. **Proceeding...** Piracicaba: FEALQ, 2011. p.127-141.

- NUSSIO, L.G.; CAMPOS, F.P.; DIAS, F.N. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2001. p.127-145.
- OLDENBURG, E. Occurrence of zearalenone in maize. **Mycotoxins Res.** 1993, v.9, p. 72-78, 1993.
- O'KIELY, P.O.; CLANCY, M.; DOYLE, E.M. Aerobic stability of grass silage mixed with a range of concentrate feedstuffs at feed-out. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., São Pedro, 2001. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p.794-795.
- ONO, E.Y.S.; BIAZON, L.; SILVA, M.; VIZONI, E.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E.; Fumonisin in corn: Correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** 49, n.1, p.63-71, 2006.
- PAHLOW, G.; MUCK, R.E. DRIEHUIS, S.J.; et al. Microbiology of ensiling. In silage science and technology. Agronomy Monograph 42. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, ed. **American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America**, Madison, WI. p. 31-93 2003.
- PALACIOS-CABRERA, H.; TANIWAKI, M.H.; HASHIMOTO, J.M.; MENEZEZ, H.C.; Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.36, n.1, p. 24-28, 2005.
- PAZIANI, S.F.; DUARTE, A.P.; NUSSIO, L.G. et al. Características agrônômicas e bromatológicas de híbridos de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.3, p.411-417, 2009.
- PEREIRA, O.G.; OLIVEIRA, A.S.; RIBEIRO, K.G.; Uso de forragens conservadas em sistemas de produção de carne: Aspectos bioeconômicos. In: Anais do IV Simpósio de Produção e Utilização de Forragens Conservadas, 4, Maringá, 2011. **Anais...** Maringá: Sthampa, 2011. p.73-94.
- PHILIPPEAU, C.; AND MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science.** v. 81, p. 2178-84. 1998.
- PHIPPS, R.H.; SUTTON, J.D.; BEEVER, D.E. et al. The effect of crop maturity on the nutritional value of maize silage for lactating dairy cows: 3. Food intake and milk production. **Animal Science**, v.71, p.401-409, 2000.

- PIETRI, A.; PIVA, G.; Occurrence and control of mycotoxins in maize grown in Italy. In: Feed production conference, 6, Piacenza, 2000. **Proceedings...** Piacenza, p. 226-236. 2000.
- PIMENTEL GOMES, F.A estatística moderna na pesquisa agropecuária. Piracicaba: POTAFOS, 1984. 160p.
- PRELUSKY, D.B.; SAVARD, M.E.; and TRENHOLM, H.L. Pilot study on the plasma pharmacokinetics of fumonisin B1 in cows following a single dose by oral gavage or intravenous administration. **Natural Toxins**, v. 3, p.389-394, 1995.
- QUEIROZ, O.C.M.; RABAGLINO, M.B.; ADESOGAN, A.T.; Mycotoxins in silage. In: II International Symposium on Forage Quality and Conservation: 2., São Pedro, 2011. **Proceeding...** Piracicaba: FEALQ, 2011 p.105-126.
- RAMMER, C.; ÖSTLING, C.; LINGVALL, P.; LINDGREN, S.; Ensiling of manured crops – effects on fermentation. **Grass and Forage Science**. v. 49, n. 3, p.343-351, 1994.
- RANJIT, N.K.; KUNG Jr., L.; The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 83, p. 526-535, 2000.
- ROSSI, F.; RIGHI, F.; FUOCHI, S.; QUARANTELLI, A.; Effects of mycotoxins on fertility of dairy cow. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria Di Parma**. v. 29, p.153-166, 2009.
- ROTZ, C.A.; MUCK, R.E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: Forage, quality, evaluation, and utilization. Madison: **ASA, CSSA, SSSA**, p. 828-868, 1994.
- RYBICKI, G.B.; LIGHTAMN, A.P.; Fundamentals of Radioactive Transfer. **Radiative Processes in Astrophysics**. Published Wiley-VCH. p.16-26, 1979.
- SANDERSON, M.A. Aerobic stability and *in vitro* fiber digestibility of microbially inoculated corn and sorghum silage. **Journal of Animal Science**. v. 71, p. 505-514, 1993.
- SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G.; Transgenic plants: Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn. **Nature**, London, v. 402, p. 480, 1999
- SCHAEFER, A.L.; COOK, N.; TESSARO, S.V.; et al. Early detection and prediction of infection using infrared thermography. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 84, p.73-80, 2004.

- SCHMID, A.R.; GOODRICH, R.D.; JORDAN, R.M. et al. Relationships among agronomic characteristics of corn and sorghum cultivars and silage quality. **Agronomy Journal**. v.68, n.1, p.403-406, 1976.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; van SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**. v.70, n.11, p.3562-3577, 1992.
- STEINFELD, H.P.; GERBER, T.; WASSENAAR, V. et al. Livestock's long shadow: environmental issues and options. Executive summary. **United Nations Food and Agriculture Organization**, Rome, 2006.
- TELLER, R. S.; SCHMIDT, R. J.; WHITLOW, L. W. and KUNJ Jr. L.; Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v.95, p.1428-1436, 2012.
- TINE, M.A.; McLEOD, K.R.; ERDMAN, R.A.;BALDWIN, R.L.; Effects of brown midrid corn silage on the energy balance of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 84, p.885-895, 2001.
- UNITED NATIONS, **World Populations Prospects: The 2010 Revision**. Disponível em: <http://esa.un.org/wpp/Excel-Data/population.htm>. acessado em: 11/03/2013.
- VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. **Journal of the association of Official Analytical Chemists**. v.46, p.829-835, 1963.
- VELHO, J.P.; MÜHLBACH, P.R.F.; NÖRNBERG, J.L. et al. Composição bromatológica de silagens de milho produzidas com diferentes densidades de compactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.36, n.5, p.1532-1538, 2007.
- VILELA, H.H.; REZENDE, A.V.; VIEIRA, P.F.; et al. Valor nutritivo de silagens de milho colhido em diversos estádios de maturação. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 37, n. 7, p.1192-1199, 2008.
- VISSERS, M.M. M.; TE GIFFEL, M.C.; DRIEHUIS, F.; et al. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. **Journal of Dairy Science**. v.90, p.3286-3293, 2007.
- WEAVER, G.A.; KURTZZ, H.J.; BEHRENS, J.C.; ROBISON, T.S. et al. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. **American Journal Of Veterinary Research**. v. 47, p.1935-1937, 1986.

- WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; and PIERRE, N. R.; A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Feed Science and technology**. v. 39, p.95-110, 1992.
- WHITLOW L.W.; and HAGLER, W.M. La contamination des aliments par les mycotoxines: un facteur de stress additionnel pour les bovins laitiers. **Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec-Symposium sur les Bovins Laitiers**: Québec, Canada, p.9-13, 2001.
- WHITLOW L.W.; and HAGLER, W.M. **The top ten most frequently-asked question about mycotoxins, cattle and dairy food products**. 1^{ed}. Nottingham, Nottingham University. 2004, 245p.
- WILES, P.G.; GRAY, I.K.; KISSLING, R C.; Routine analysis of protein by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study dairy products. **Journal of the association of Official Analytical Chemists**. Washington, v. 81, p.620-632, 1998.
- WOOD, G.E. and M.W. TRUCKSESS. Regulatory control programs for mycotoxin-contaminated food. pp. 459-45 1. In: K.K. Sinha and D. Bhatnagar (Eds.) **Mycotoxins in Agriculture and Food Safety**. Markel Dekker, Inc., New York.
- WOOLFORD, M.K.; BOLSEN, K.K.; PEART, L.A.; Studies on the aerobic deterioration of whole-crop cereal silages. **Journal of Agricultural Science**. v.98, 529–535, 1982.
- WOOLFORD, M.K. and WILKIE, A.C. Investigations into the role of specific micro-organisms in the aerobic deterioration of maize silage. **Journal of Agricultural Science**. v. 102, p. 97-104, 1984
- WOOLFORD, M.K. The detrimental effect of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**. v.68, p.101-116, 1990.
- YOUSEF, A.E.; and MARTH, E.H. Use of ultraviolet energy to degrade aflatoxin M1 in raw or heated milk with and without added peroxide. **Journal of Dairy Science**. v. 69, p.2243-2247, 1986.

APÊNDICES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CENTRO DE PESQUISA EM
FORRAGICULTURA (CPFOR)



Determinação da degradação aeróbia de silagens e presença de micotoxinas por imagens em infravermelho, em silos de grande porte

Código de Identificação:

Proprietário:

Fazenda:

Município:

Fone:

e-mail:

Hora chegada:

Hora saída:

Temp. ambiente:

Coordenada GPS – Latitude:

Longitude:

Pontos amostrados:

Ponto Quente (Q) - temp. interna:	°C	pirômetro	°C	Fotos:
Ponto Médio (M) - temp. interna:	°C	pirômetro	°C	Fotos:
Ponto Frio (F) - temp. interna:	°C	pirômetro	°C	Fotos:

Observações climáticas (temperatura, luminosidade, vento, chuva, etc):

Vento: () ausente; () leve; () intenso; () muito forte | **temp. vento:** () frio; () ambiente

Luminosidade: () fraca; () moderada; () intensa | **Céu:** () aberto; () nublado; () Parc. Nub.

Pluviosidade: () seco; () garoa leve; () garoa intensa; () chuva;

Outros:

Tipo de silo:

Revestido com:

Tamanho do silo - h:

L:

C:

Tamanho das partículas: () Bem picado () Razoável () Mal picado

Compactação: () Boa () Média () Ruim

Lona: () preta comum () dupla face () Outra:

Tempo decorrido após última retirada de silagem?

Observações (Retirada uniforme do painel; lama; fungos, cobertura do silo, etc):



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CENTRO DE PESQUISA EM
FORRAGICULTURA (CPFOR)



PROJETO DE PESQUISA:

Determinação da degradação aeróbia de silagens e presença de micotoxinas por imagens em infravermelho, em silos de grande porte

Prof. Dr. Patrick Schmidt – UFPR
(41 – 3350-5704 / 41 – 9131-9300)

As perguntas devem ser respondidas considerando o silo que foi amostrado por nossa equipe

Código de Identificação:

Proprietário:

Fazenda:

Município:

Fone:

e-mail:

Atividades: () Leite () Corte () Ovinos () Outras:

Número de animais na propriedade?

Há quanto tempo produz silagem?

Como define o ponto de colheita?

Quando a silagem foi feita?

Quanto dias para fechar o silo?

Há quanto tempo o silo foi aberto?

Após a retirada a lona permanece: () levantada () abaixada

Utilizou aditivo? () não () sim Qual?:

Como foi feita a colheita? () ensiladeira acoplada ao trator () automotriz

Recebeu acompanhamento técnico durante a produção da silagem? Qual?

Qual foi a cultura anterior ao milho?

Sistema de plantio: () convencional () plantio direto () cultivo mínimo

Houve incidência de pragas na cultura? () Não () Sim. Qual?

Altura de corte do milho: () normal (20 cm) () corte alto/parte aérea (40-60 cm)

Adubação nitrogenada: () uréia () sulfato de amônio () esterco de aves

() esterco suíno () esterco bovino () outro

Vossa colaboração é muito importante para nossa pesquisa. Você receberá um laudo com resultados das análises de sua silagem. Em caso de dúvidas entre em contato conosco e visite nosso site: www.ensilagem.com.br